

ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG UND MIKROSKOPISCHE ANATOMIE

HERAUSGEGEBEN UND REDIGIERT VON

W. BARGMANN

KIEL

B. SCHARRER

NEW YORK

J. SEILER

ZÜRICH

53. BAND, 2. HEFT

MIT 111 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 4. JANUAR 1961)



SPRINGER-VERLAG

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

1961

Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Begründet 1924 unter dem Titel: Zeitschrift für Zellen- und Gewebelehre. Redigiert von R. Goldschmidt und W. von Möllendorff. Bd. 2—28 (1938). Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie. (Bd. 1—20), 1934 als: Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie Abteilung B) herausgegeben von R. Goldschmidt, W. von Möllendorff, H. Bauer, J. Seiler. Bd. 29—33 (1944) Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie Abteilung A. Allgemeine Zellforschung und mikroskopische Anatomie. Herausgegeben und redigiert von W. von Möllendorff und J. Seiler. Berlin, Springer. Bd. 34—35 (1948—1950) Springer, Wien, ab Bd. 36 Springer, Berlin, ab Bd. 34 ohne den Untertitel Abteilung A, Allgemeine Zellforschung usw.

Ab Bd. 2 (1925) mit dem Untertitel: Fortsetzung des SCHULTZE-WALDEYER-HERTWIGschen Archivs für mikroskopische Anatomie. [Dieses wurde begründet 1864. Bd. 1—13 (1876) herausgegeben von Max Schultze; Bd. 13, Heft 4, bis Bd. 35 (1890) herausgegeben von v. La Valette St. George, W. Waldeyer; Bd. 36—43 (1894) herausgegeben von O. Hertwig, v. La Valette St. George, W. Waldeyer. Ab Bd. 44 als Archiv f. mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte, ab Bd. 77—95 (1910—1922) in 2 Abteilungen. Bd. 1—95, Bonn, Cohen. Ab Bd. 96 Berlin, Springer. Fortsetzung Bd. 98—104 (1923—1925) Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik. Herausgegeben von W. Roux, H. Braus, H. Spemann.]

Die Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie steht Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der beschreibenden und experimentellen Zellen- und Gewebelehre sowie dem Gebiet der mikroskopischen Anatomie des Menschen und der Tiere offen, wobei Arbeiten mit funktionellem und experimentellem Inhalt bevorzugt werden.

Arbeiten karyologischen Inhalts werden an die Zeitschrift „Chromosoma“, Arbeiten zur histochemischen und histophysikalischen Grundlagenforschung, insbesondere ihrer Methodik, an die Abteilung „Histochemie“ weitergeleitet.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e.V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Alle Manuskripte sind zu senden und Anfragen zu richten an:

Prof. Dr. W. Bargmann, Kiel, Anatomisches Institut der Universität, Neue Universität, Eingang F 1,

Prof. Dr. Berta Scharrer, Albert Einstein College of Medicine, Dept. of Anatomy, Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, N.Y., USA,

Prof. Dr. J. Seiler, Zürich 6, Sonneggstr. 45.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301, Fernschreibnummer 01-83319
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61723

53. Band

Inhaltsverzeichnis

2. Heft
Seite

YASUZUMI, G., G. I. KAYE, G. D. PAPPAS, H. YAMAMOTO and I. Tsubo, Nuclear and cytoplasmic differentiation in developing sperm of the crayfish, <i>Cambaroides japonicus</i> . With 17 Figures in the Text	141
KAYE, G. I., G. D. PAPPAS, G. YASUZUMI and H. YAMAMOTO, The distribution and form of the endoplasmic reticulum during spermatogenesis in the crayfish, <i>Cambaroides japonicus</i> . With 10 Figures in the Text	159
WENDT, E., Die Wirkung von Röntgenstrahlen auf das Zentroplasma und die Cytosomen von Gewebekulturzellen. Mit 13 Textabbildungen	172
LEVEQUE, T. F., and G. A. HOFKIN, Demonstration of an alcohol-chloroform insoluble, periodic acid-schiff reactive substance in the hypothalamus of the rat. With 6 Figures in the Text	185
HÖHLING, H.-J., Elektronenmikroskopische Untersuchungen am gesunden und kariösen Dentin mit Hilfe der Abdruckmethode und der Schnittmethode an kompakter, nicht-entmineralisierter Substanz. Mit 10 Textabbildungen	192
KNESE, K.-H., und A.-M. KNOOP, Über den Ort der Bildung des Mukopolysaccharid-proteinkomplexes im Knorpelgewebe. Elektronenmikroskopische und histochemische Untersuchungen. Mit 30 Textabbildungen	201
IURATO, S., Submicroscopic structure of the membranous labyrinth. 2. The epithelium of CORTI's organ. With 25 Figures in the Text	259

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift bezieht sich ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

From the Department of Anatomy, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, U.S.A., and the Electron Microscope Research Laboratory, Department of Anatomy, Nara Medical College, Kashihara, Japan

NUCLEAR AND CYTOPLASMIC DIFFERENTIATION IN DEVELOPING SPERM OF THE CRAYFISH, *CAMBAROIDES JAPONICUS**

By

G. YASUZUMI, G. I. KAYE**, G. D. PAPPAS, H. YAMAMOTO, and I. TSUBO

With 17 Figures in the Text

(Received August 18, 1960)

Introduction

Spermatogenesis in the decapod crustacea has been extensively studied with light microscope techniques (for review, see YASUZUMI 1960). The differentiation of these sperm cells is of particular interest because they are aflagellate. However, this unique differentiation has not been clearly elucidated because of the low resolving power of the light microscope used in the earlier studies, and because many of the studies were done before the development of more precise cytochemical procedures such as the Feulgen, azure B, and PAS techniques (HERMANN 1890, BINFORD 1913, FASTEN 1914). As described by MOSES (1956), and YASUZUMI (1960), every structure in the sperm cell of this form has been assigned every possible origin and fate. With the superior resolving power and more precise morphological characterization available with the use of the electron microscope, it has been possible to study the differentiation of decapod sperm and clarify many of the areas of confusion. These include the apparent fate of the centriole, the development of the acrosome, the disappearance of mitochondria, and the relationship between the developing sperm and the nutritive cell.

Materials and Methods

Testes of *Cambaroides japonicus* were fixed for 30—60 minutes at 5° C in 1% OsO₄ buffered at pH 7.2 with veronal acetate. The tissue was transferred without washing to 70% ethanol, and left for 1 to 10 hours in this solution. Further dehydration was performed with 80% ethanol (30 minutes), 90% ethanol (10 minutes), 95% ethanol (5 minutes), and 100% ethanol (1—3 minutes). The tissue was transferred to a mixture of 1:1 ethanol-methacrylate (60 minutes), then to a mixture of 20% methyl methacrylate and 80% butyl methacrylate. Three 20 minute changes of this solution were used, the last two of which contained 2% Lupercol CDB as a catalyst. Final embedding was effected in a fresh solution of the latter mixture which was polymerized in an oven at 46° C. Sections were cut on a Porter-Blum microtome using glass knives; sections were mounted on copper grids coated with formvar. The dried sections were stained according to a slight modification of WATSON'S (1958) lead acetate procedure, and a thin coat of carbon evaporated onto them. They were examined in an RCA EMU 3 C electron microscope. For light microscopy, 1—2 micron sections of material fixed

* Supported in part by Grant No. B 2314 of the National Institute of Neurological Diseases and Blindness, U.S. Public Health Service.

** Predoctoral Research Fellow of the National Institute of Neurological Diseases and Blindness, U.S. Public Health Service.

in osmic acid were examined, in addition to material which had been embedded in paraffin and which had been fixed in formalin or alcohol. Smear preparations and sections were stained with the Feulgen, methyl green-pyronine, and PAS techniques.

Observations

Centrioles

A typical metaphase plate (*M*) and spindle structure (*S*) are visible (Fig. 1) during the metaphase, anaphase, and telophase of the second spermatocyte

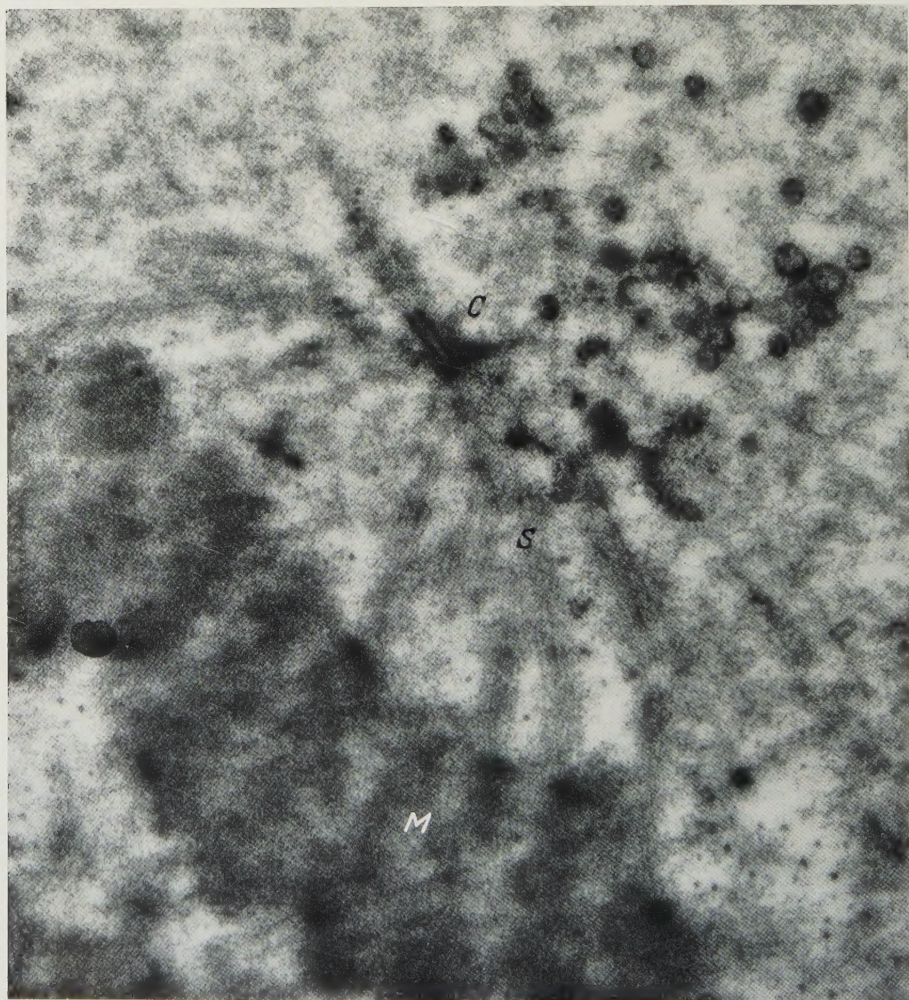


Fig. 1. Electron micrograph of a section through a metaphase plate (*M*) of a cell in the second spermatocyte division. The centriole (*C*) as well as spindle fibers (*S*) are present. Magnification 25,300 \times

division. Fine spindle fibers radiate from the centriole to the chromosomes. Similar fibers appear to comprise the aster. Following reconstruction of the nuclear envelope after division, these fibers remain visible for some time (Fig. 2) and are often seen to aggregate at the cytoplasmic bridges between the developing spermatids. Between groups of fibers, dense granules appear in the periphery of the

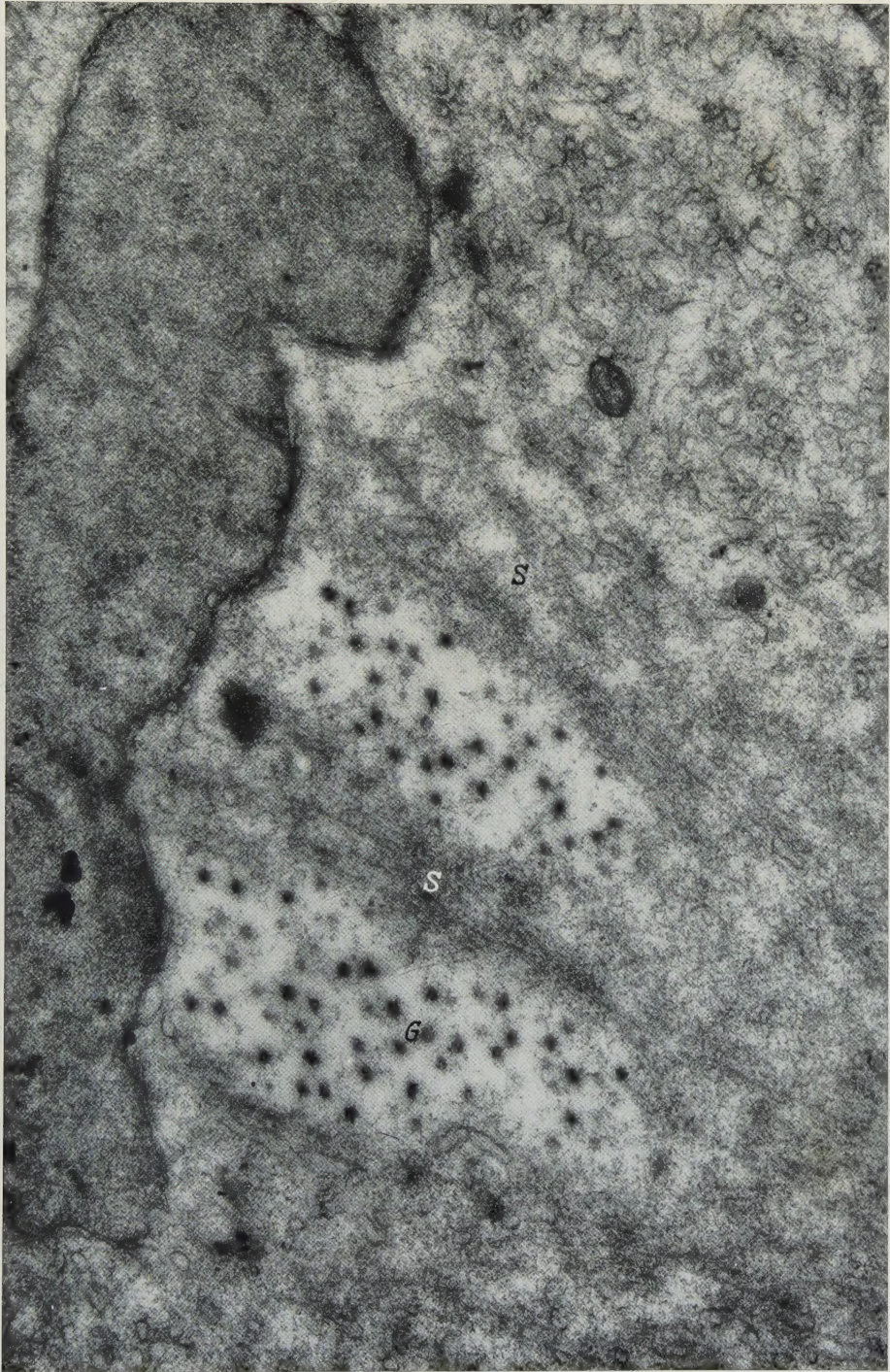


Fig. 2. Section through an early spermatid. Spindle fibers (*S*) persist in the cytoplasm. Some granular material (*G*) may be seen between groups of spindle fibers. Magnification 28,900 \times

10*

metaphase plate as well as in the aster region. After division the granules aggregate at one side of the cell.

In the newly formed spermatid, the paired centriole (*C*) with some granules surrounding it moves from a juxta-nuclear position to the intercellular bridge

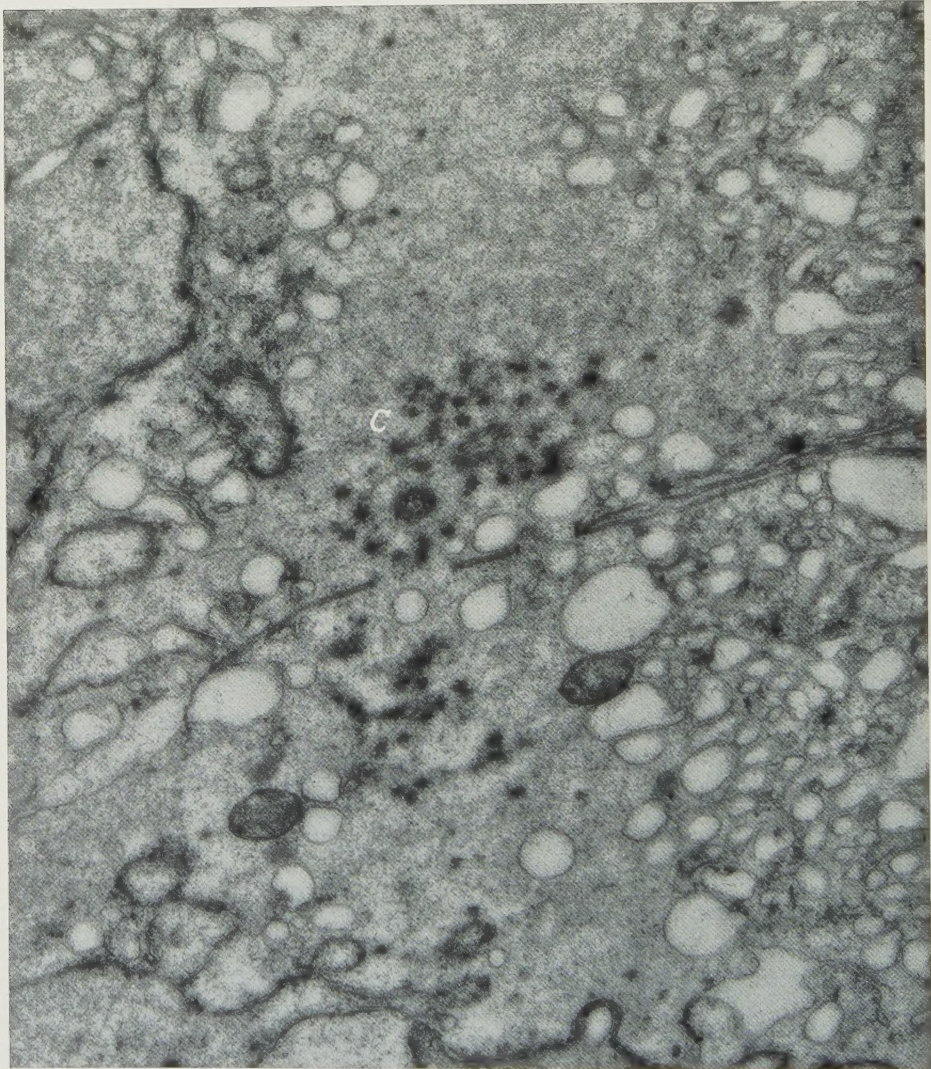


Fig. 3. Section through two spermatids showing cytoplasmic continuity or bridges between the cells. Two centrioles (*C*) associated with granular material similar to that seen in Figure 2 can be seen in one of the cells. Magnification 56,000 \times

area (Fig. 3). In these aflagellate sperm, the centrioles (*C*) do not appear to undergo any further differentiation after the second spermatocyte division. The centrioles are found randomly oriented among the membranes of the filamentous endoplasmic reticulum (Fig. 4) from the late spermatid stage to the mature sperm at which time they apparently begin to disintegrate (Fig. 5). It had been suggested

from light microscopic observations (McCROAN 1940, NATH 1956) that the centriole pushes into the base of the acrosome (vesicle). This is clearly not the case in this form because the centrioles are often found on the opposite side of the nucleus from the acrosome (Fig. 4).

Mitochondria

The few mitochondria in the early spermatid tend to aggregate at one side of the nucleus (Fig. 6). Light microscope studies by McCROAN (1940) and NATH

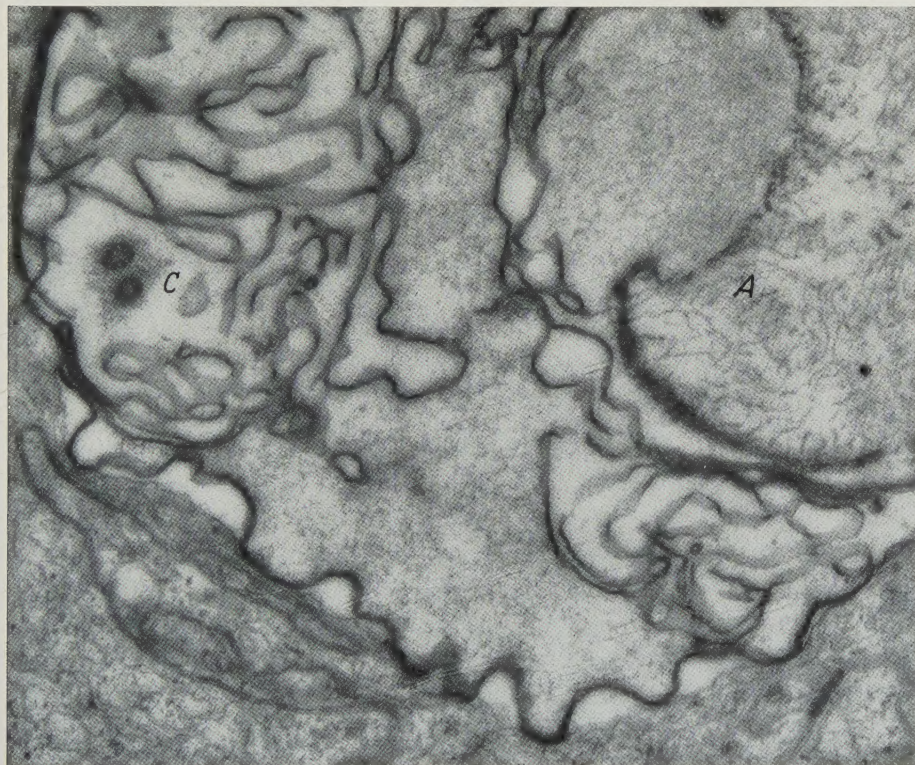


Fig. 4. Section through an almost mature sperm. Two centrioles (C) are present on the side of the nucleus opposite to the acrosome (A). Magnification 28,900 \times

(1956) have suggested that the material which borders the acrosome may develop from mitochondria. While this cannot be confirmed by the present study, there is some indication of an association of the mitochondria with the acrosomal bud in the spermatid (Fig. 7).

The apparent disappearance of the mitochondria by the late spermatid stage is not clearly understood. No mitochondria are recognizable in the mature sperm. The possibility that the complex lamellations of the nuclear envelope in the mature sperm (Fig. 8) may be related to mitochondria or perhaps Golgi is discussed in a separate communication (KAYE et al. 1960).

Acrosome

As stated above, there is an apparent segregation of dense granules (*G*) (Fig. 9) at one side of the cell in the early spermatid. These granules appear to lose some of their density and become smaller in the course of differentiation of the acrosomal bud (Fig. 7). In the following stage, the acrosomal material becomes

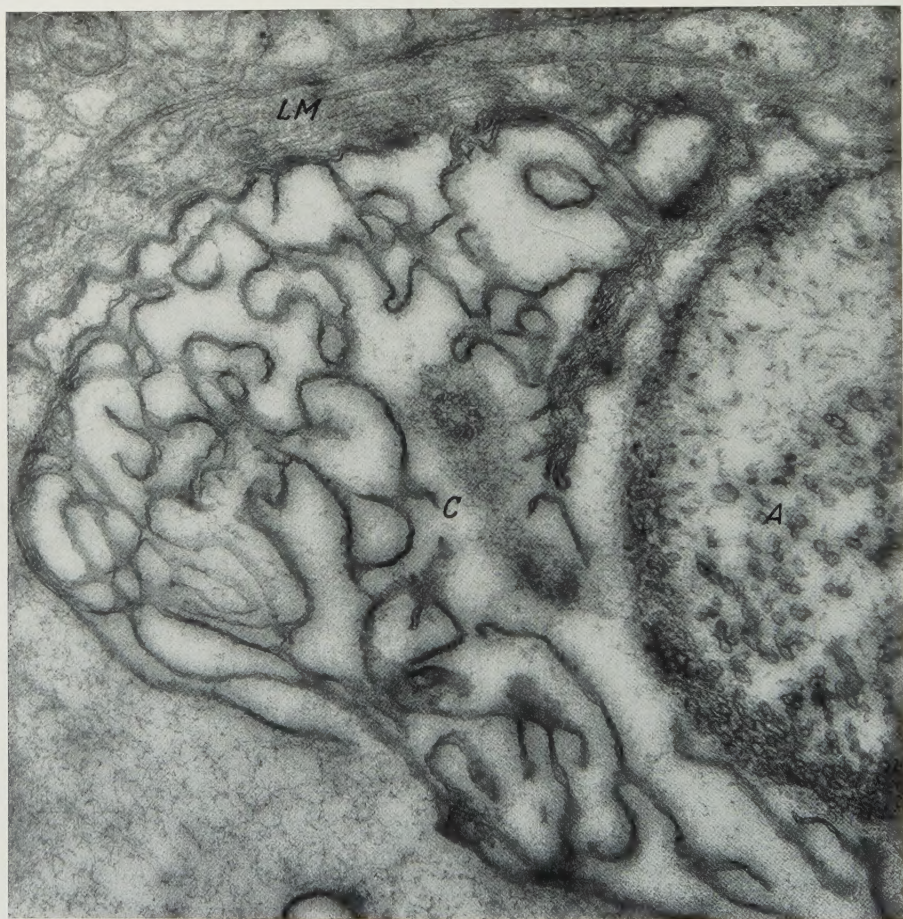


Fig. 5. Section through a later sperm stage than in Figure 4. The centrioles (*C*) appear to be degenerating. The acrosome (*A*) is passing from a tubular to a fibrous condition. Paired convoluted membranes forming the filamentous endoplasmic reticulum can be seen. Laminated membranes (*LM*) of the nutritive cell are found adjacent to the sperm. Magnification 42,000 \times

homogeneous (Fig. 10). Subsequently, tubular elements develop within the substance of the acrosome (Fig. 11), apparently derived from the membranous border of this organelle.

As differentiation proceeds, these tubular elements within the acrosome disappear and seem to be replaced by fibrous elements (Fig. 4) which further differentiate into a relatively homogeneous material. In the mature acrosome, dense fibrous structures remain only at the junction of the granular border and the homogeneous matrix (Fig. 14).

During the development of the acrosome, an invagination appears at its base where this structure is closest to the nucleus (Fig. 4). The cytoplasm which fills the invagination is a granular material of intermediate density which stains lightly with fast green. It is separated from the acrosome by the membranous and later by the granular border of the acrosome. The material of the invagina-

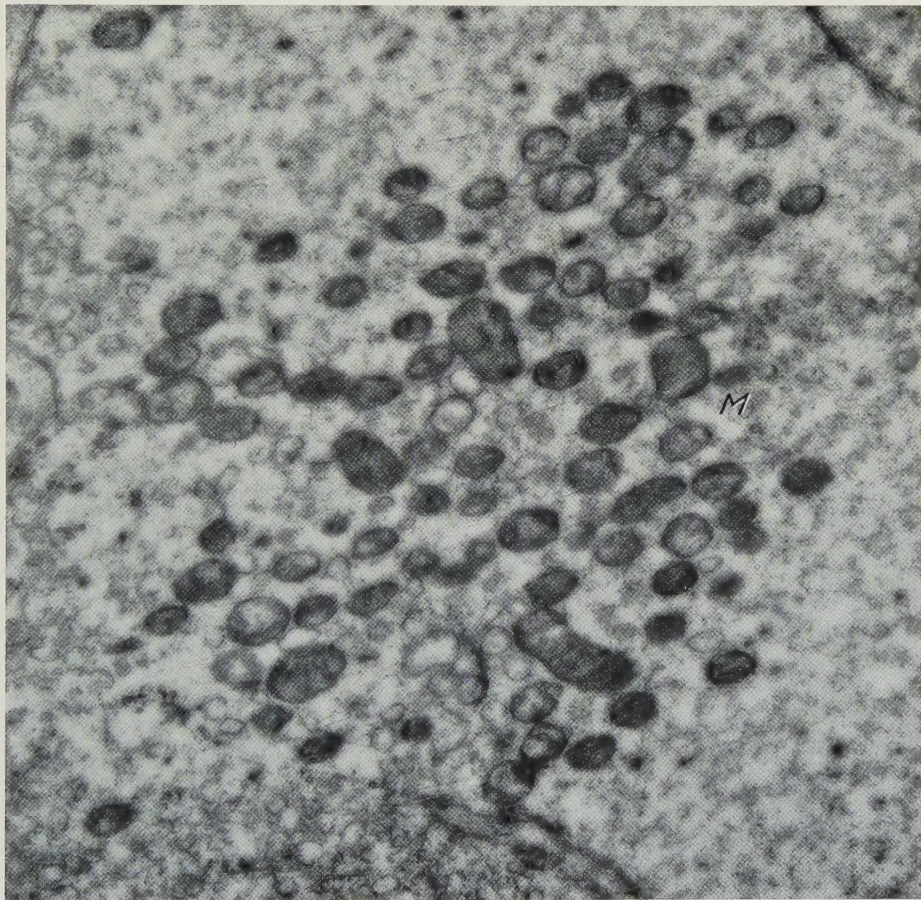


Fig. 6. Section through an early spermatid. Although the mature sperm apparently lacks mitochondria groups of mitochondria are typical in the early spermatid. Magnification 28,900 \times

tion does not appear to be separated by any structure from the area of the filamentous endoplasmic reticulum which fills the cytoplasm between the nucleus and acrosome. However, there is a clear segregation of this material from the less dense ground cytoplasm (Fig. 4).

Nucleus

The condensation of the nucleus in the developing spermatid, and the fashion by which the nuclear envelope contributes membranous material and 150 Å particles to the cytoplasm, has been previously described (MOSES 1956, KAYE et al.

1960). The continuity of the nuclear envelope with the endoplasmic reticulum (KAYE et al. 1960) is evident at all stages of development (Fig. 4, 11, 15).

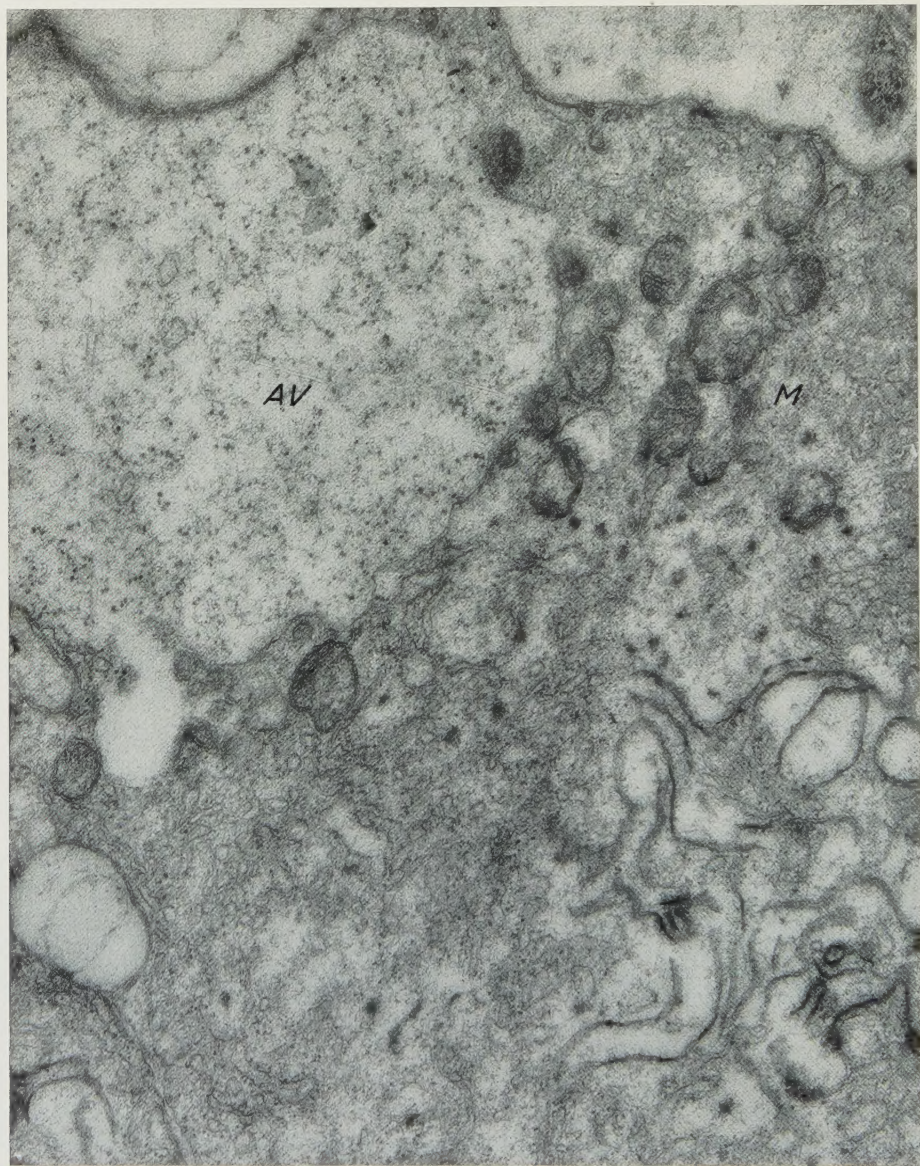


Fig. 7. Section through a spermatid. The acrosomal vesicle (*AV*) has a finer granularity than that of the earlier stage shown in Figure 9. A cluster of mitochondria (*M*) is seen adjacent to the acrosomal vesicle. Magnification 29,000 \times

During the course of development, the nucleus maintains an approximately equatorial position (Fig. 4, 10, 11). The nucleoplasm, which has a fine fibrillar structure, is of lower density in the late spermatid and maturing sperm than in the early spermatid. Late in the maturation of the sperm, this fine fibrillar

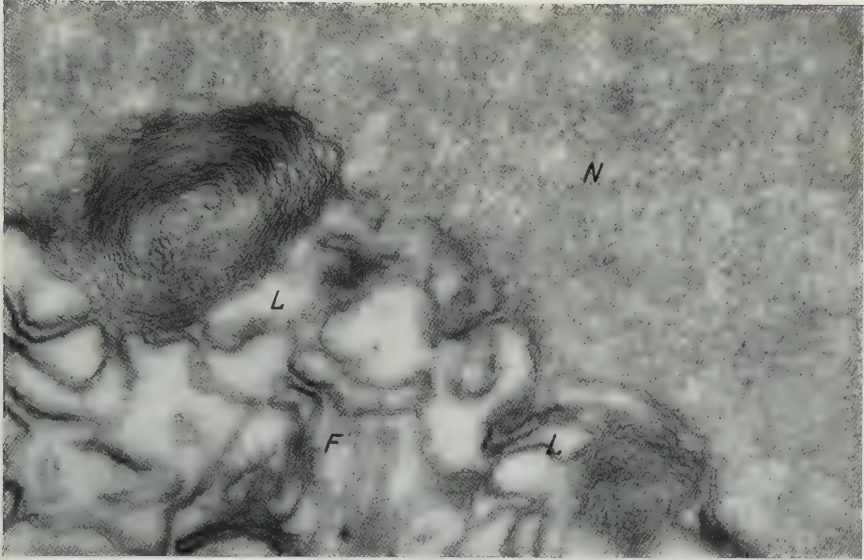


Fig. 8. Two lamellar bodies (*L*) in close association with the nucleus are found in this late spermatid. Membranes of the lamellar bodies are continuous with both the nuclear envelope (*N*) and the membranes of the filamentous endoplasmic reticulum (*F*). Magnification 42,000 \times

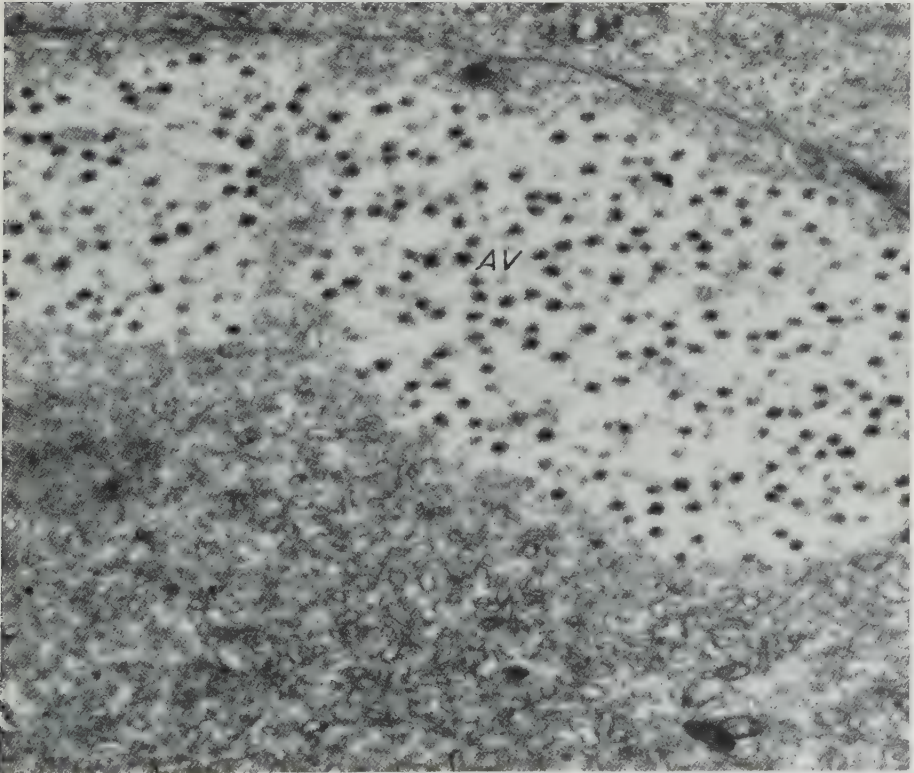


Fig. 9. Section through an early spermatid. The acrosomal vesicle (*AV*) contains dense granules similar in appearance to those found in the interzonal spindle region during and after the second spermatocyte division (Figures 2 and 3). Magnification 21,700 \times

structure is slowly replaced by a more coarse system of thicker fibers (Fig. 12). This alteration is accompanied by the compression of the nucleus and the pushing out of its margins, forming the four arms (pseudopodia) which are typical of the mature sperm (Fig. 13). These arms are Feulgen positive (McCROAN 1940), and exhibit the coarse fibrous structure typical of the nucleus of the mature sperm.

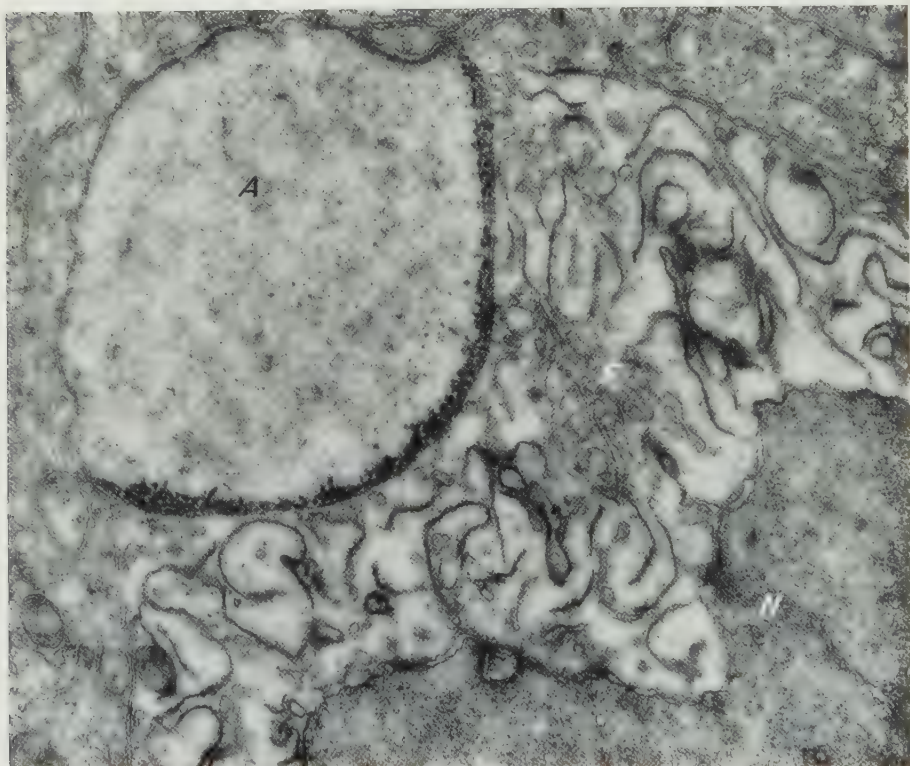


Fig. 10. Electron micrograph of a late spermatid. The acrosome (A) has a homogeneous granular appearance. Dense granular material replaces the membranes which earlier form the internal border of this organelle. Filamentous endoplasmic reticulum is present in the cytoplasm (F). N, nucleus. Magnification 29,000 \times

Nutritive Cell

As in most forms, the spermatids of *Cambaroides japonicus* are arranged either radially about a nutritive cell or along the lateral edges and apex of a dependent nutritive cell (Fig. 15). There is a great reduction in the size of the spermatid as differentiation proceeds. The material lost is probably transferred to the nutritive cell. Granular material of similar size and density to that which forms the acrosomal bud may be seen in the nutritive cell after the second spermatocyte division. The same type of granule may be found occasionally within the complex mitochondria of the nutritive cell (Fig. 16). The heavy accumulation of granular endoplasmic reticulum which is characteristic of the nutritive cells may be seen in Fig. 16 and 17. Projections of the nutritive cell containing this reticulum completely surround the developing sperm.

The complex internal structure of the mitochondria of the nutritive cell (Fig. 16, 17) associated with the late stages of spermatogenesis is of particular interest when compared with the complex lamellar structures found associated with the nuclear envelope of the sperm (Fig. 8). The mitochondria, which earlier in development contain primarily the villous type of cristae, now develop complex

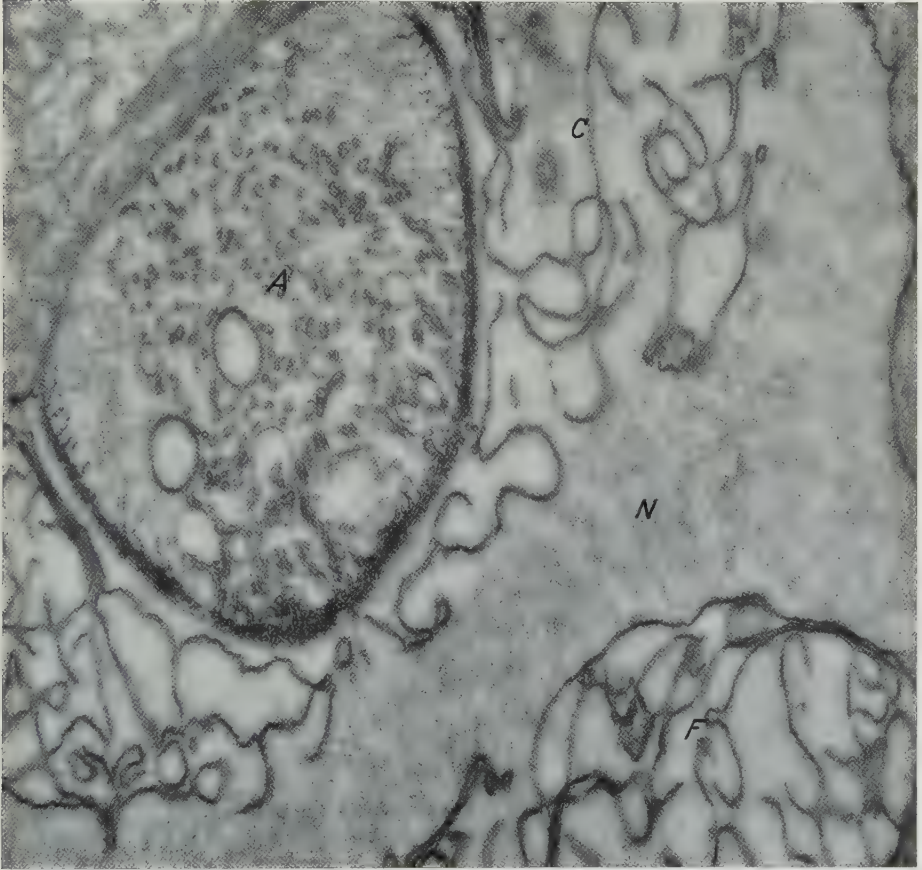


Fig. 11. Electron micrograph of a section through an early sperm. The acrosome (*A*) is filled with tubular membranous material. The nucleus (*N*) occupies an equatorial position in the cell. A pair of centrioles (*C*) appear to be disintegrating. Filamentous endoplasmic reticulum (*F*) is found in the cytoplasm

concentric lamellae in their periphery. At later stages, the major portion of the space within the mitochondrion may be occupied by concentric lamellae and only a small number of villi are found in the center.

Discussion

This study of spermatogenesis in the crayfish, *Cambaroides japonicus*, has clarified certain areas concerning this process. Classical light microscopic observations on decapod spermatogenesis have been reviewed in a previous communication (YASUZUMI 1960). It is clear from even a brief survey of the literature, that, due to the limitations of resolution of the light microscope and the scarcity of

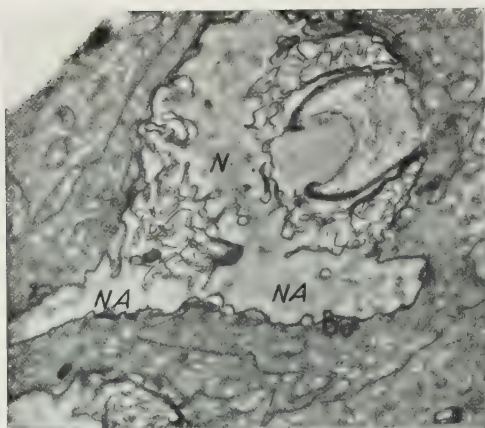


Fig. 13

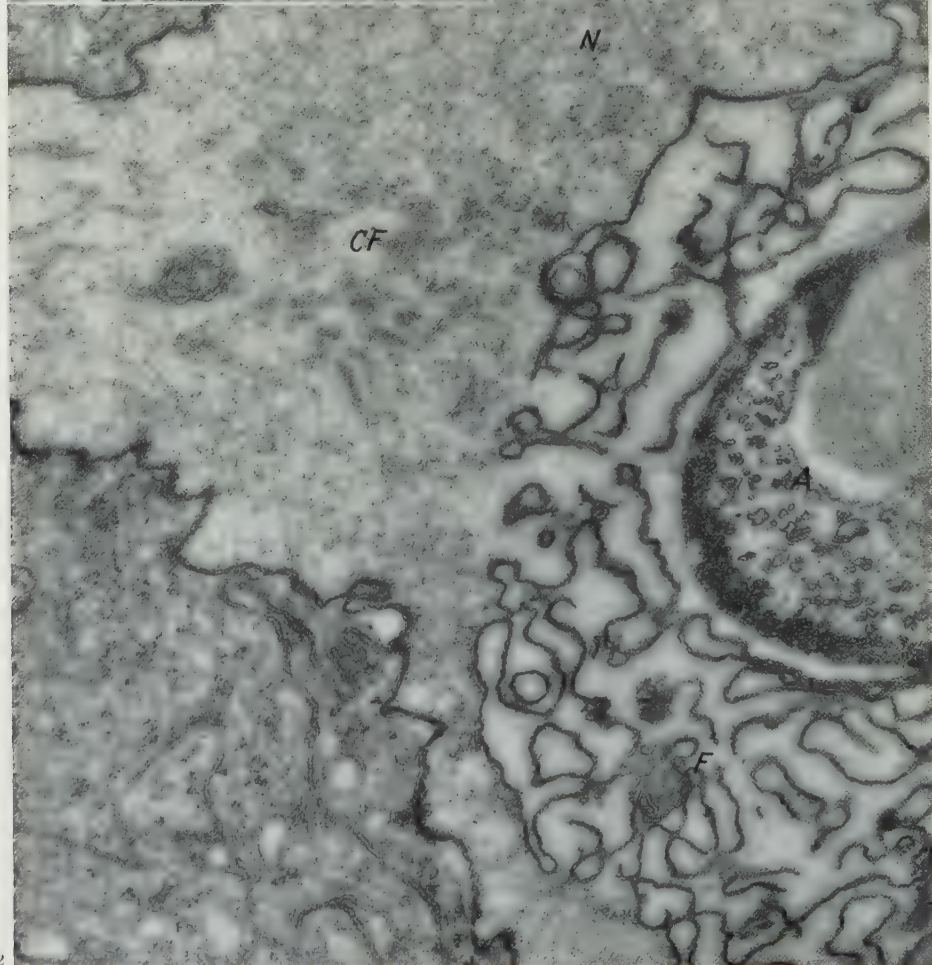


Fig. 12

Fig. 12. Section through a nearly mature sperm in which the nucleus (*N*) is developing the fibrous material (*CF*) which is typical of the mature sperm. The acrosome (*A*) can also be seen as well as the filamentous endoplasmic reticulum (*F*). Magnification $29,000\times$

Fig. 13. In this electron micrograph two nuclear arms (*NA*) can be seen developing from the nucleus (*N*). Magnification $7,000\times$

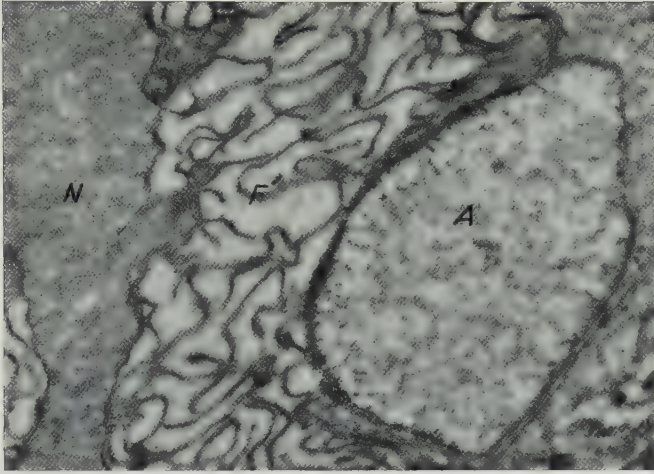


Fig. 14. Section through a portion of a late sperm. The acrosome (*A*) appears more homogeneous again with only a few dense fibers remaining at the margin of the acrosome. *N*, nucleus, *F*, filamentous endoplasmic reticulum. Magnification 21,700 \times

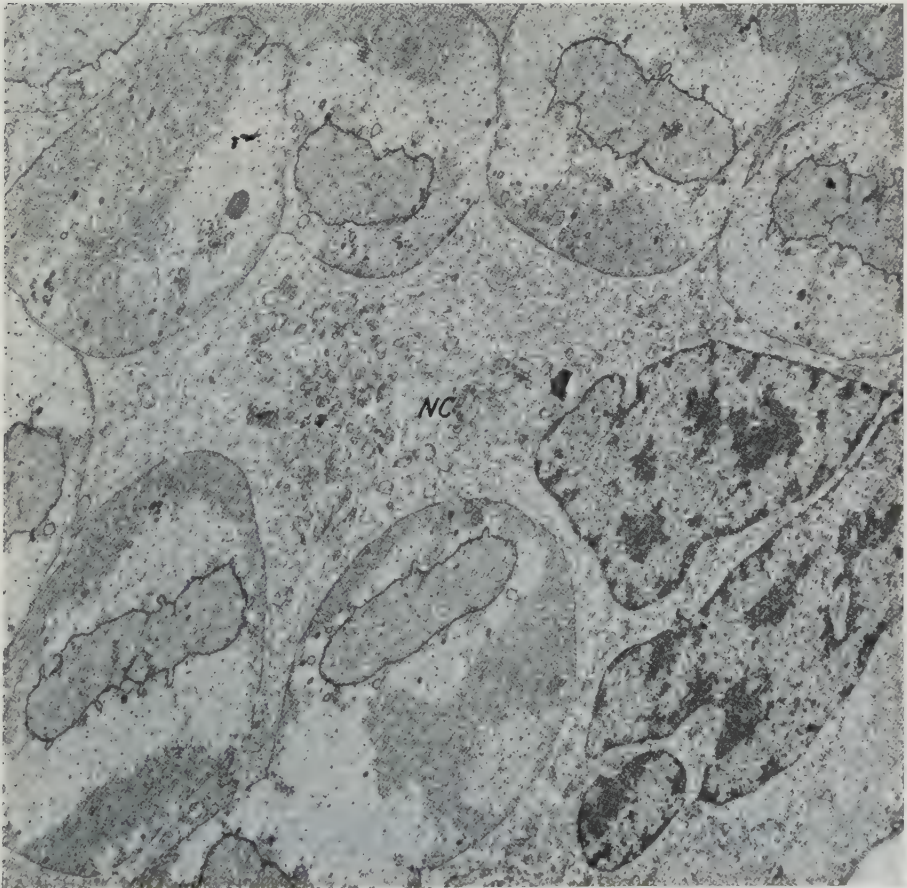


Fig. 15. Low power electron micrograph showing the relationship of a nutritive cell (*NC*) to the spermatids. Magnification 4,700 \times

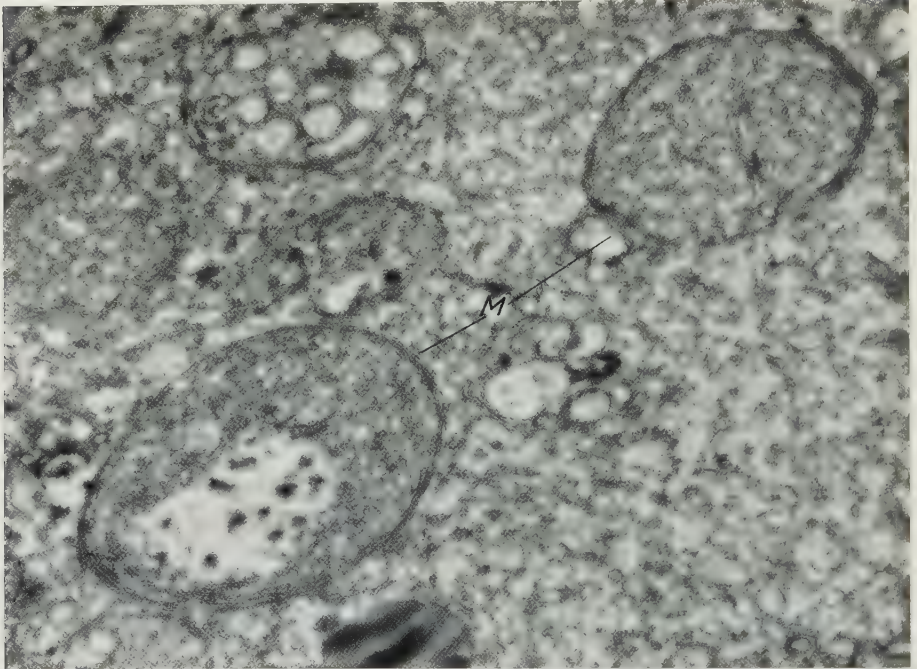


Fig. 16. Section through a portion of a nutritive cell containing two mitochondria (*M*). The foldings of the inner membrane of the mitochondria are very complex. In the stroma of one mitochondrion a few dense granules are present. Magnification 21,700 \times

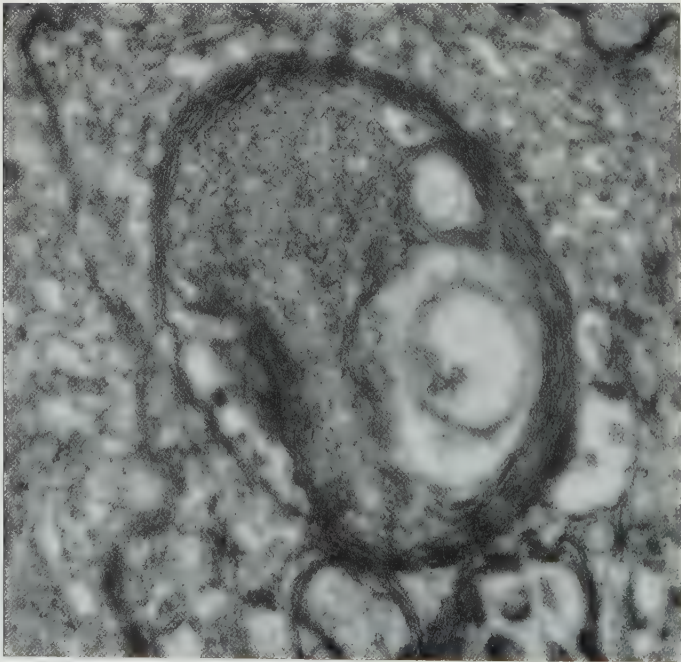


Fig. 17. Section through a nutritive cell mitochondrion which has a very dense array of lamellar membranes at the periphery. Magnification 36,000 \times

quantitative cytochemical procedures available to the early workers, the origins and early differentiation of many cytoplasmic structures have been variously attributed to all possible sources (HERMANN 1890, FASTEN 1914, GRABOWSKA 1929, BOWEN 1925).

It was not until the work of McCROAN (1940), that identification by the Feulgen reaction of the nuclear material of all stages of crayfish spermatogenesis was accurately described. Although HERMANN (1890) identified the arms of the mature sperm as nuclear material by careful study of their derivation, it again remained for McCROAN (1940) to show that the arms contained Feulgen-positive material. In the present study, it has been possible to demonstrate the formation of these arms (Fig. 12 and 13) from the nucleus, and to show that the fine structure within the arms is the same as that found in the main portion of the nucleus.

Centrioles and Spindle

The persistence of the spindle material, and its close approximation to the intercellular bridges, is apparently a common phenomenon in sperm differentiation (FAWCETT et al. 1959, YASUZUMI et al. 1960). According to FAWCETT (1959), the persistence of spindle material between the daughter cells may prevent the formation of the new cell membrane, and may be the origin of the intercellular bridges. At a later stage, this spindle material apparently disintegrates, leaving the intercellular bridge as a passage for exchange between joined cells. The disruption of the spindle material may be responsible in some way for the movement of the centrioles from a juxtannuclear position in the early spermatid to a position close to the intercellular bridge.

While the centriole in flagellate sperm continues to differentiate into the basal structures of the flagellum (KÖLLIKER 1899, BURGOS and FAWCETT 1955), the future of the centriolar material in aflagellate sperm has not been adequately described. Previous workers have suggested that the invagination at the base of the acrosome (vesicle) seen in decapod sperm is composed of centrioles and associated material (McCROAN 1940, NATH 1956). While the nature of this invagination has not yet been definitely established, it is clear (Fig. 4) that it is not associated with the centriole. The centriole is found randomly placed among the convoluted membranes of the filamentous endoplasmic reticulum and can be followed to the stage at which it apparently disintegrates (Fig. 5).

Mitochondria

The apparent disappearance of typical mitochondria from the developing crayfish sperm is of interest in the light of the suggestions by McCROAN (1940), and NATH (1956) that the acrosome, or at least the membrane of this organelle, may be of mitochondrial origin. This point is still not clear although a close association of mitochondria with the developing acrosomal vesicle has been observed (Fig. 7). No typical mitochondria are recognizable in the mature sperm.

Acrosome

The association of the Golgi complex with acrosome formation in flagellate sperm has been described by BURGOS and FAWCETT (1955), LEBLOND and CLERMONT (1952), and FAWCETT and ITO (1958).

The relation of Golgi material to vesicle formation in the radial sperm has been difficult to demonstrate. Using light microscope techniques, previous workers have attributed the origin of the acrosome to the nucleus (BOWEN 1925), mitochondria (McCROAN 1940, NATH 1956), and to what they described as Golgi (NATH 1956, GRABOWSKA 1929). BOWEN (1925) was one of the earliest workers to maintain that the vesicle of radial sperm corresponded to the acrosome of typical flagellate sperm, although he believed it was derived from the nucleus. MOSES (1956), and YASUZUMI (1960) have reported PAS-positive staining in the vesicle of decapod sperm and therefore homologized or identified this structure with the acrosome of flagellate sperm. NATH (1956) has described the formation of the Golgi apparatus in decapod sperm by the fusion vesicular mitochondria, and the subsequent formation of the acrosome from the Golgi material. In our studies it has not been possible to identify any typical Golgi complex in the developing crayfish sperm. Nor does the agranular vesicular endoplasmic reticulum which forms the major mass of the cytoplasm appear to be especially associated with the acrosomal vesicle (Fig. 9). Occasionally, mitochondria (Fig. 7) appear in close association with this developing organelle. It is possible that the aggregation of mitochondria observed in the early spermatid (Fig. 6) may have been identified in light microscope studies as developing Golgi or that the mitochondria and adjacent agranular endoplasmic reticulum may have produced the osmiophilic reaction used to identify the Golgi in earlier studies. The development of the transitory tubular structures in the border matrix of the acrosome during its differentiation (Fig. 11, 12) suggest an origin from a membranous structure. It is probable therefore that specialized membranes such as "Golgi elements" are not significant in this form.

Nutritive Cell

The developing spermatid and sperm of *Cambaroides japonicus* are completely surrounded by processes of the nutritive cell (see Fig. 13). In later stages, multilaminate membranes apparently formed by the endoplasmic reticulum of the nutritive cell, surround the developing sperm (Fig. 4). It appears, however, that the greatest transfer of material from the sperm to the nutritive cell occurs in the early spermatid stage.

The complex development of the mitochondria in the nutritive cell during the late stages of sperm differentiation is of interest when compared to the complex lamellar structures associated with the nuclear envelope of the sperm at this stage (Fig. 8). It has been suggested (KAYE et al. 1960) that the paranuclear lamellar structures in the sperm may be related to the formation of mitochondria. The structural similarity of the nutritive cell mitochondria and the complex lamellar bodies of the sperm may be seen in Fig. 8, 16 and 17.

Summary

In the present electron microscopic study of spermatogenesis in the crayfish, *Cambaroides japonicus*, it was possible to clarify several aspects of the unusual differentiation which leads to the production of an aflagellate sperm. The centriole is followed from the metaphase of the second spermatocyte division to the time at which, in the nearly mature sperm, it appears to disintegrate. It has no

connection with the acrosome but in the late spermatid and maturing sperm it is found randomly oriented among the convoluted membranes of the filamentous endoplasmic reticulum.

There appears to be a close association of mitochondria with the developing acrosomal vesicle. Typical mitochondria, however, are not present after the late spermatid stage of development. It is suggested that the complex lamellar bodies associated with the nuclear envelope in the late stages of spermatogenesis may be related to mitochondria for these lamellar bodies resemble the complex mitochondria found in the adjacent nutritive cells.

The development of the acrosome has been traced from an aggregate of dense granules which first appear in the interzonal spindle region and are later segregated at one side of the cell after the second spermatocyte division. As differentiation proceeds, tubular elements appear and disappear within the acrosome, while somewhat later, fibrous elements appear in the matrix. In the mature acrosome, the fibrous elements remain only adjacent to the granular periphery of the acrosome and the core again becomes homogeneous.

No typical Golgi complex is found in these cells at any time during their differentiation.

In the maturing sperm the development of the arms of the nucleus was studied. Preceding the differentiation of the arms a coarse fibrous material develops in the periphery of the nucleus. It is shown that the fibrillar material in the matrix of the arms is in continuity with the fibrillar material in the matrix of the nucleus proper.

Bibliography

- BINFORD, R.: The germ cells and the process of fertilization in the crab, *Menippe mercenaria*. J. Morph. **24**, 147—204 (1913).
- BOWEN, R. H.: Further notes on the acrosome of the animal sperm. The homologies of non-flagellate sperms. Anat. Rec. **31**, 201—232 (1925).
- BURGOS, M., and D. W. FAWCETT: Studies on the fine structure of the mammalian testis. I. Differentiation of the spermatids in the cat (*Felis domestica*). J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 287—300 (1955).
- FASTEN, N.: Spermatogenesis of the American crayfish *Cambarus virilis* and *Cambarus immunis* (?), with special reference to synapsis and the chromatoid bodies. J. Morph. **25**, 587—650 (1914).
- FAWCETT, D., and S. ITO: Observations on the cytoplasmic membranes of testicular cells, examined by phase contrast and electron microscopy. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 135—142 (1958).
- FAWCETT, D. W., S. ITO and D. SLAUTTERBACK: The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. J. biophys. biochem. Cytol. **5**, 453—460 (1959).
- GRABOWSKA, Z.: Über die Plasmakomponenten (Golgi-Apparat u. a.) in den männlichen Geschlechtszellen von *Potamobius Astacus* L. Polska Akad. Umiejtnosci., Krakow Bull. Internat. Acad. Polon. Sci. et Lettres, Ser. B Zool. **2**, 197—214 (1929).
- HERMANN, G.: Notes sur la structure et le developpement des spermatozoides chez les decapodes. Bull. Sc. France et Belg. **22**, 1—59 (1890).
- KAYE, G. I., G. D. PAPPAS, G. YASUZUMI and H. YAMAMOTO: The distribution and form of the endoplasmic reticulum during spermatogenesis in the crayfish, *Cambaroides japonicus*. Z. Zellforsch. **53**, 159—171 (1960).
- KÖLLIKER, R. A.: Handbuch der Gewebelehre des Menschen, Bd. 3. Leipzig: Wilhelm Engelmann 1899.
- LEBLOND, C. P., and Y. CLERMONT: Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "periodic acid-fuchsin sulfurous acid" technique. Amer J. Anat. **90**, 167—216 (1952).
- Z. Zellforsch., Bd. 53

- McCROAN jr., J. E.: Spermatogenesis of the crayfish *Cambarus virilus* with special reference to Golgi material and mitochondria. *Cytologia* (Tokyo) **11**, 136—155 (1940).
- MOSES, M. J.: Studies on nuclei using correlated cytochemical, light, and electron microscope techniques. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl., 397—406 (1956).
- NATH, V.: Cytology of spermatogenesis. *Internat. Rev. Cytol.* **5**, 395—453 (1956).
- WATSON, M. L.: Staining of tissues for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 727—730 (1958).
- YASUZUMI, G.: Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. VII. Spermatid differentiation in the crab, *Eriocheir japonicus*. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 73—78 (1960).
- H. ISHIDA, S. NAKANO and H. YAMAMOTO: Spermatogénèse des animaux révélée par le microscope électronique. IX. Etude au microscope électronique de la télophase des spermatocytes de *Cipangopaludina malleata* et de *Gelastorhinus biocolor* de Haan avec des remarques sur les Nebenkerns. *J. ultrastruct. Res.* **3**, 484—494 (1960).

Professor G. D. PAPPAS, Columbia University, Dept. of Anatomy,
New York 32, N.Y., 630 West, 168th Street

From the Department of Anatomy, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, U.S.A., and the Electron Microscope Research Laboratory, Department of Anatomy, Nara Medical College, Kashihara, Japan

THE DISTRIBUTION AND FORM OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM DURING SPERMATOGENESIS IN THE CRAYFISH, *CAMBAROIDES JAPONICUS**

By

G. I. KAYE**, G. D. PAPPAS, G. YASUZUMI and H. YAMAMOTO

With 10 Figures in the Text

(Received August 18, 1960)

Introduction

Many authors, notably PALADE (1955, 1956), WATSON (1955), PORTER (1956, 1960), and PALAY (1955), have advanced the concept of the endoplasmic reticulum as a membrane-bound cytoplasmic system which may be, at times, in continuity with the nuclear envelope and the plasma membrane. Most of the evidence on which these authors have based this finding has been derived from surveys of many cell types randomly selected with respect to their physiological activity. The study of the endoplasmic reticulum during spermatogenesis offers the possibility of following changes and relationships in this system in a sequential order relative to the specific function of the cell during differentiation.

In the early electron microscopic studies of spermatogenesis in crayfish, MOSES (1956), and RUTHMAN (1958), have described certain isolated aspects of the form of the endoplasmic reticulum and indicated the direction which the present study has attempted to follow.

During the differentiation of the crayfish sperm cells various forms of the endoplasmic reticulum have been found to be sequentially predominant. In the present study, four closely related membrane systems are found in the cytoplasm of the developing sperm. These are described as: 1) the annulate lamellae, 2) the agranular vesicular endoplasmic reticulum, 3) the large filamentous reticulum [the convoluted membrane (MOSES 1956)], and 4) the densely packed lamellae associated with the nuclear envelope.

Material and Methods

Testes of *Cambaroides japonicus* were fixed for 30—60 minutes at 5° C in 1% OsO₄ buffered at p_H 7.2 with veronal acetate. The tissue was dehydrated with ethanol and embedded in methacrylate according to the schedule of YASUZUMI et al. (1960). Sections were cut on a Porter-Blum microtome using glass knives. These were mounted on copper grids coated with formvar and stained according to a slight modification of WATSON's (1958) lead acetate procedure. A thin coat of carbon was evaporated on top of the sections. Grids were examined in an RCA EMU 3C electron microscope.

* Supported in part by Grant No B-2314 of the National Institute of Neurological Diseases and Blindness, U.S. Public Health Service.

** Predoctoral Research Fellow of the National Institute of Neurological Diseases and Blindness, U.S. Public Health Service.

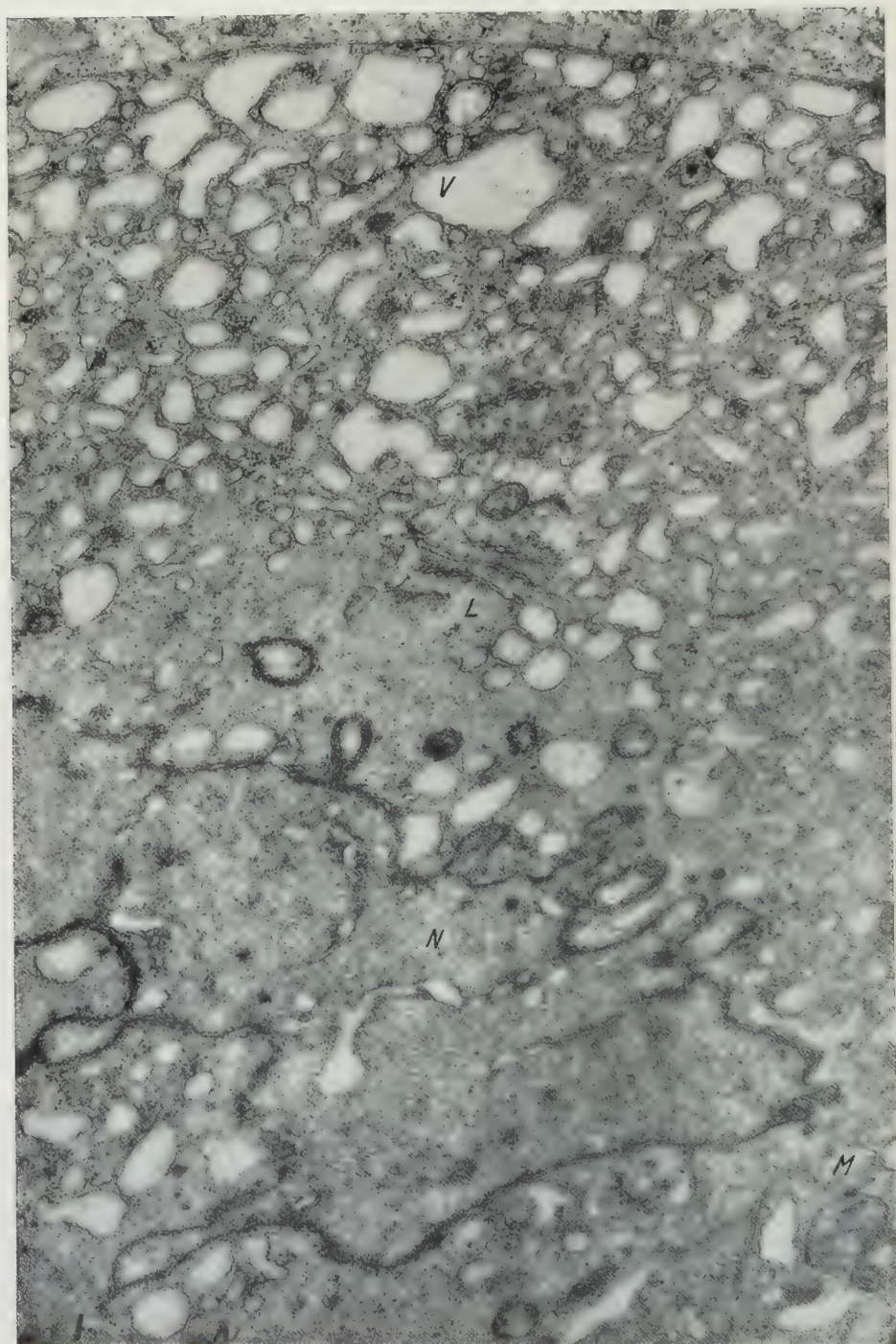


Fig. 1. Electron micrograph of a section through an early spermatid of the crayfish, *Cambaroides japonicus*. Blebbing along the margins of the nuclear envelope (*N*) is evident. In the cytoplasm two forms of the endoplasmic reticulum are visible, the lamellar (*L*) and large agranular vesicular (*V*) forms. A small mitochondrion (*M*) can be seen. Magnification 28,900 \times

Observations

The nucleus exhibits an unusual behavior which had been described by MOSES (1956) as "blebbing" (Fig. 1) following the reconstitution of the nuclear

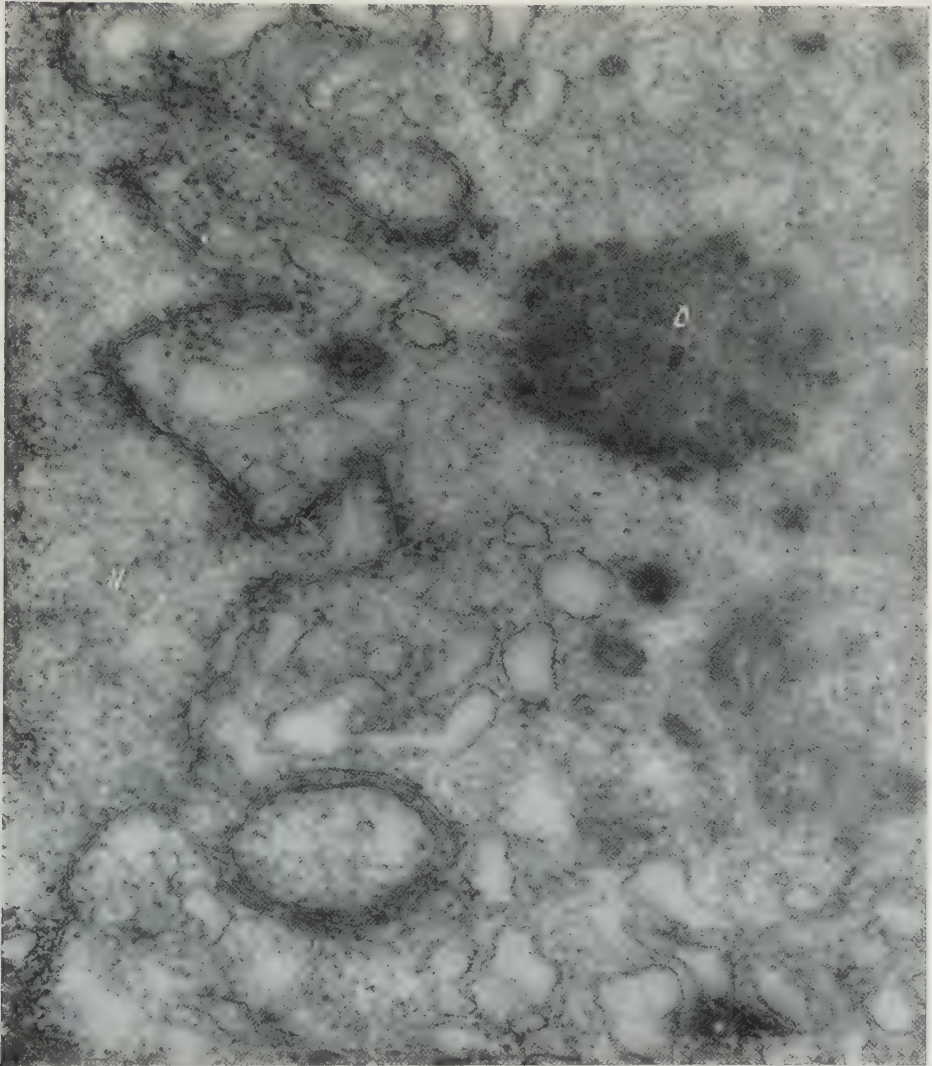


Fig. 2. Higher magnification of nucleus (N) in the early spermatid showing details of the nuclear envelope. Note that the multiple membranes of the blebs indicate that the process is not merely a simple evagination of the two membranes of the nuclear envelope. Particles (150A) can be found adhering to both membranes. A pair of centrioles (C) can be seen in the cytoplasm as well as a dense body (D). Magnification 56,000 \times

envelope after the completion of the second meiotic division. While MOSES did not resolve the fine structure of these blebs it is clear from Fig. 1 that they are evaginations of both membranes of the nuclear envelope and are closely associated with particles. Fig. 1 also shows two other typical forms of the endoplasmic reticulum which may be found in the early spermatid: 1) small stacks of flattened

cisternae (*L*), and 2) large vesicular or vacuolated cisternae (*V*). Both types have particles which are apparently distributed randomly on the membranes.

At higher magnification (Fig. 2), the association of particles with the blebs can be seen, as well as the relation of these particles with the outer membrane

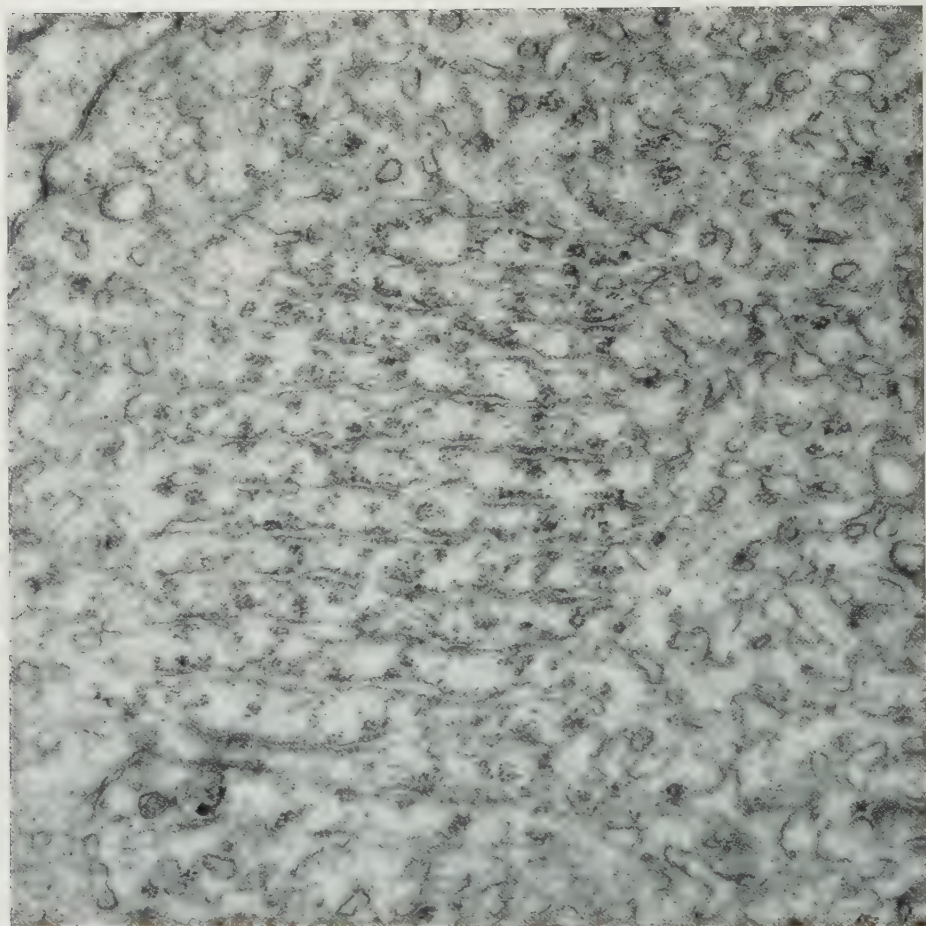


Fig. 3. Electron micrograph of a portion of the cytoplasm of a cell in the prophase of the second spermatocyte division showing lamellar endoplasmic reticulum with granules adhering to its membranes in continuity with agranular vesicular reticulum. Magnification 34,650 \times

of the nuclear envelope. Particles of similar density may be noted on the inner surface of the inner membrane of the nuclear envelope. A pair of centrioles (*C*) are also present close to the nucleus in Fig. 2.

Several forms of the endoplasmic reticulum seen in these cells are demonstrated in Fig. 3 and 4. Fig. 3, from a cell in the prophase of the second spermatocyte division, shows that the "rough" surfaced endoplasmic reticulum (associated with 150 A particles) is continuous (at arrows) with the "smooth" tubular or agranular vesicular endoplasmic reticulum comprising most of the system. Fig. 4, from a slightly later stage, shows that the more densely packed cisternae

which have been described in these cells as annulate lamellae by REBHUN (1956) and RUTHMAN (1958) are also continuous with the agranular vesicular endoplasmic reticulum. The regularity of the spacing of the annulae is apparent in this micrograph.

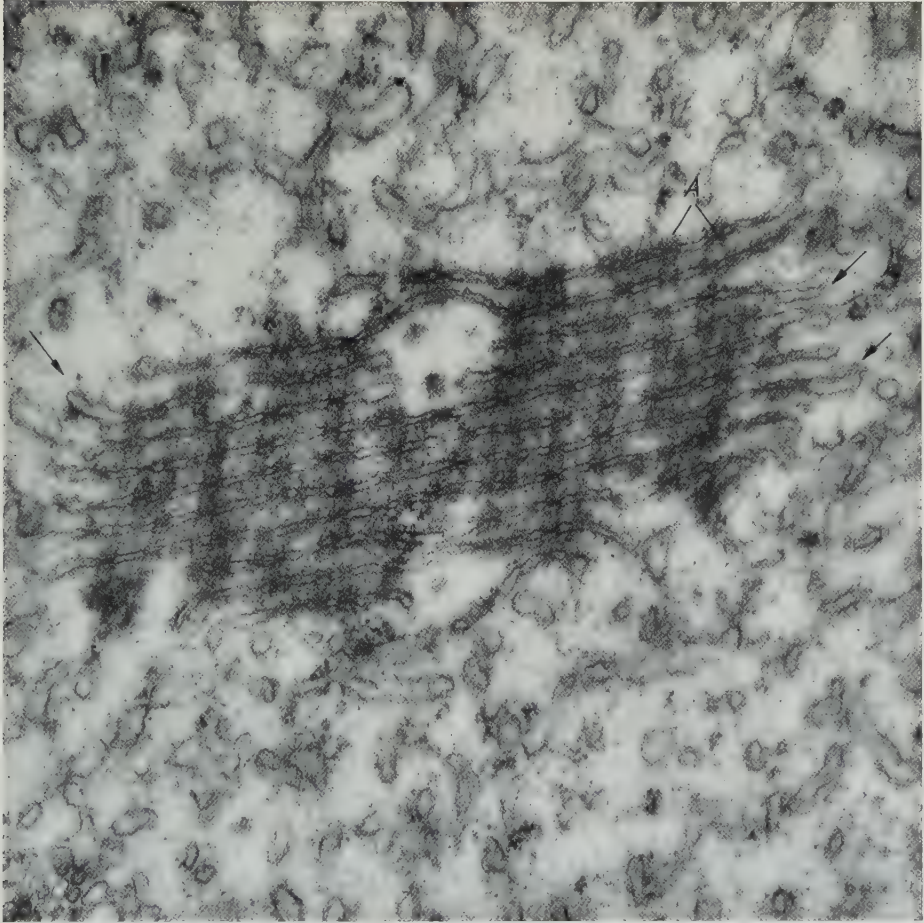


Fig. 4. Electron micrograph of a cell somewhat later in the prophase of the 2nd spermatocyte division than that in Figure 3 showing regularly arranged annulate lamellae. Continuity of this form with the agranular vesicular reticulum is shown at arrows. Note the regularity of the spacing of the annulae (A). Magnification 36,400 \times

As differentiation of the spermatid proceeds, the peripheral portions of the endoplasmic reticulum become so densely packed that the vesicular elements appear arranged in an almost crystalloid fashion (Fig. 5).

Slightly later in the process of maturation, a fusion of membranous elements probably occurs. This leads to a reduction in number, and an increase in thickness and density of the individual membrane components of the reticulum (Fig. 6). In Fig. 7, this form of the reticulum (the convoluted membranes of MOSES 1956) which becomes the predominant form in the mature sperm (Fig. 8) is in continuity with the vesicular form, which in turn is continuous with the lamellar form.

Elements of this dense filamentous endoplasmic reticulum are composed of two membranes (see Fig. 9 and 10).

Fig. 8 depicts a nearly mature sperm, possessing almost exclusively the large filamentous form of the endoplasmic reticulum. These membranes, as noted by MOSES (1956), may be in direct continuity with the nuclear envelope. The com-

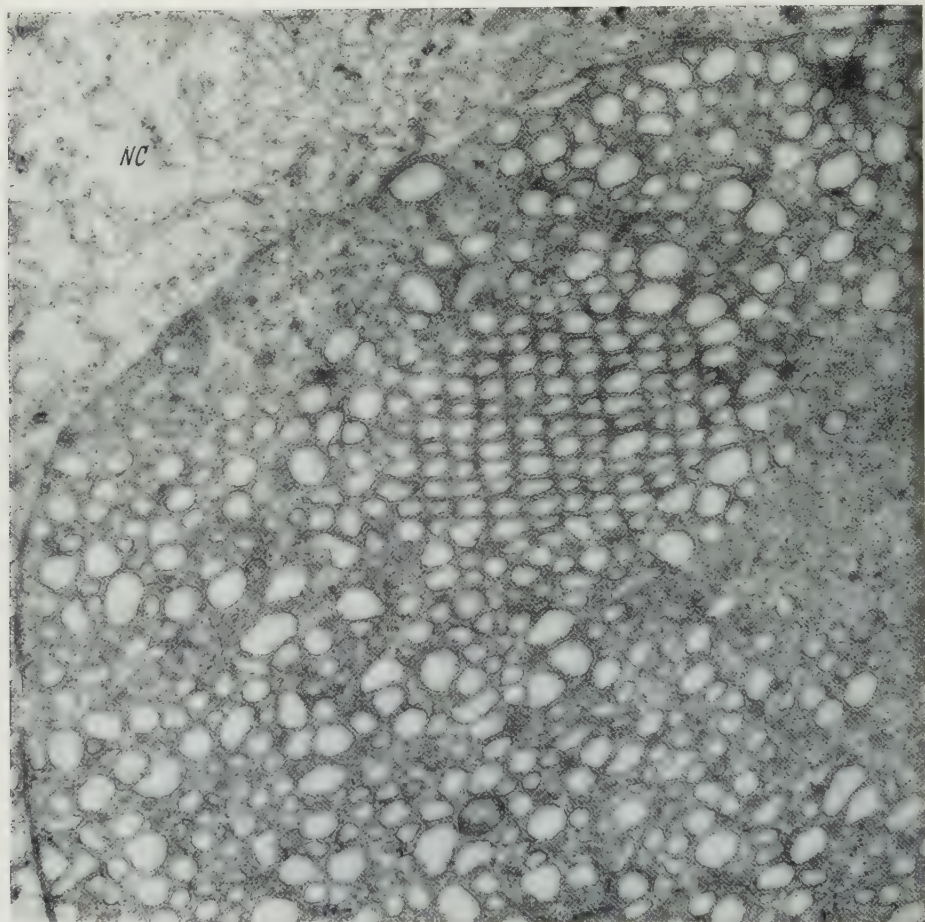


Fig. 5. Micrograph of a spermatid showing the agranular vesicles of the endoplasmic reticulum packed tightly together in the cytoplasm of this cell. This form of the reticulum is predominant at this stage. A portion of the nutritive cell cytoplasm is shown (NC). Magnification 26,700 \times

plex membranous structure seen in the acrosome is apparently a transitory phase in the development of this organelle and is discussed in a previous publication (YASUZUMI et al. 1960).

In the last stages of maturation of the spermatid, tightly packed stacks of concentric lamellae appear on the nuclear envelope (Fig. 9). These structures are intimately connected with both the nuclear envelope and the filamentous endoplasmic reticulum. Their intimate relationship, and continuity with the nuclear envelope, suggest their origin from this structure. The concentric lamellae

sometimes are suggestive of the structure of the complex mitochondria of the nutritive cell at certain stages in this species (YASUZUMI et al. 1960).

Discussion

Physiological and biochemical studies had clearly indicated the important interrelationship of the nucleus and cytoplasm in the development and function

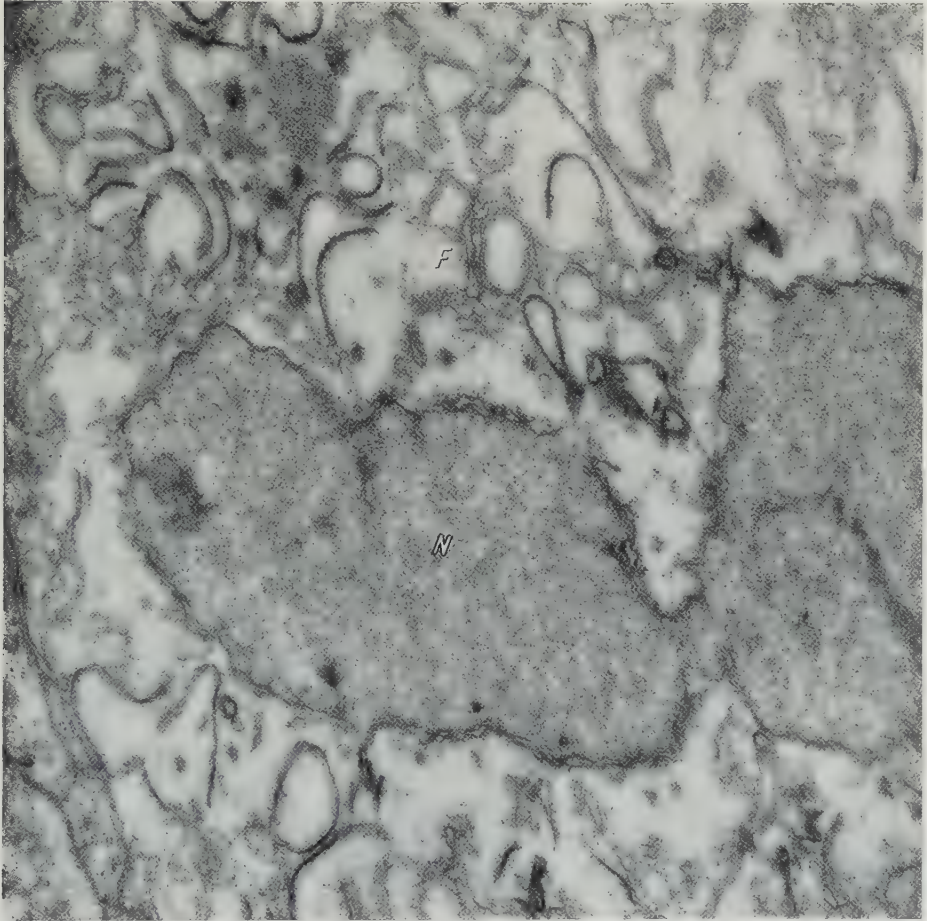


Fig. 6. Micrograph of a late spermatid. Apparent fusion of the membranes of the vesicular reticulum is producing the dense filamentous reticulum (*F*) which is typical of the mature sperm. Many of the membranes have a close relationship with the nucleus (*N*). Magnification 28,900 \times

of the cell (ALLFREY, MIRSKY and STERN 1955, GOLDSTEIN and PLAUT 1955, BRACHET 1955, 1957). The limited resolution of the microscopes available to cell morphologists before the development of electron microscopy had hindered the understanding of these interrelationships. With the advent of adequate fixation and sectioning techniques for the examination of cells with the electron microscope, several of the mechanisms by which the nucleus may interact with the cytoplasm have emerged (CALLAN and TOMLIN 1950, POLLISTER et al. 1954, WATSON 1954, 1955). Pores in the nuclear envelope, and the continuity of the

outer nuclear membrane with the cytological endoplasmic reticulum, may provide a morphological basis for the mutual transfer of material (WATSON 1955, PALADE 1956, and PORTER 1960).

In following the differentiation of the spermatid of the crayfish, it has been possible to demonstrate continuity of the membranes of the nuclear envelope

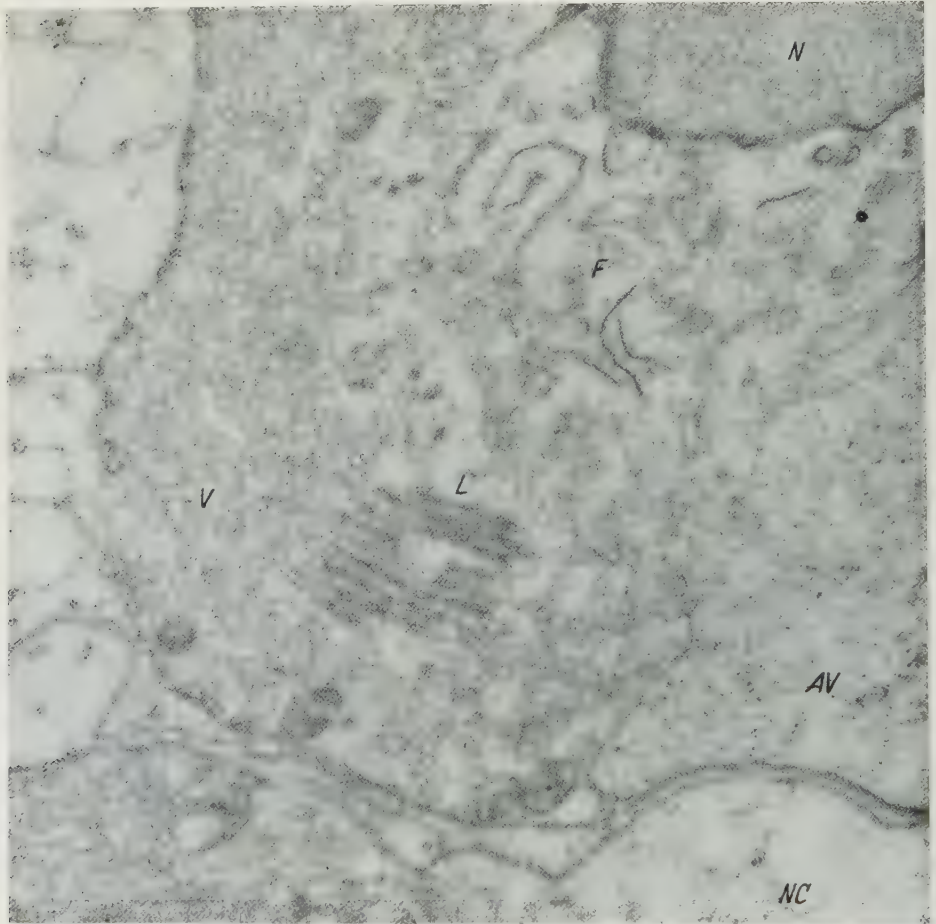


Fig. 7. Electron micrograph of the late spermatid in which three forms of the endoplasmic reticulum lamellar (*L*), vesicular (*V*) and filamentous (*F*) are shown to be in continuity. A portion of the nucleus (*N*) as well as the acrosomal vesicle (*AV*) can be seen. Portions of the nutritive cell (*NC*), are found at the edges of the micrograph. Magnification 25,000 \times

and the cytoplasmic elements of the endoplasmic reticulum at all stages examined. It has also been possible to clarify the nature of the blebs first described by MOSES (1956). Because of the fact that the nuclear outline appeared blebbed in thick sections stained with the Feulgen procedure, MOSES was uncertain whether this might be a mechanism by which the nucleus lost DNA. It is now clear that the blebbing contributes membrane elements and RNP particles to the cytoplasmic membrane systems at this stage of development. Whether the RNP particles have been newly synthesized under the direction of the nucleus

following division and are acting as carriers of the information necessary for the further differentiation of the cell is a subject which must be further investigated using the appropriate biochemical and radioisotopic techniques.

The elaborations of the nuclear envelope in the late stages of maturation (Fig. 9) strongly resemble the structure of some mitochondria in the nutritive

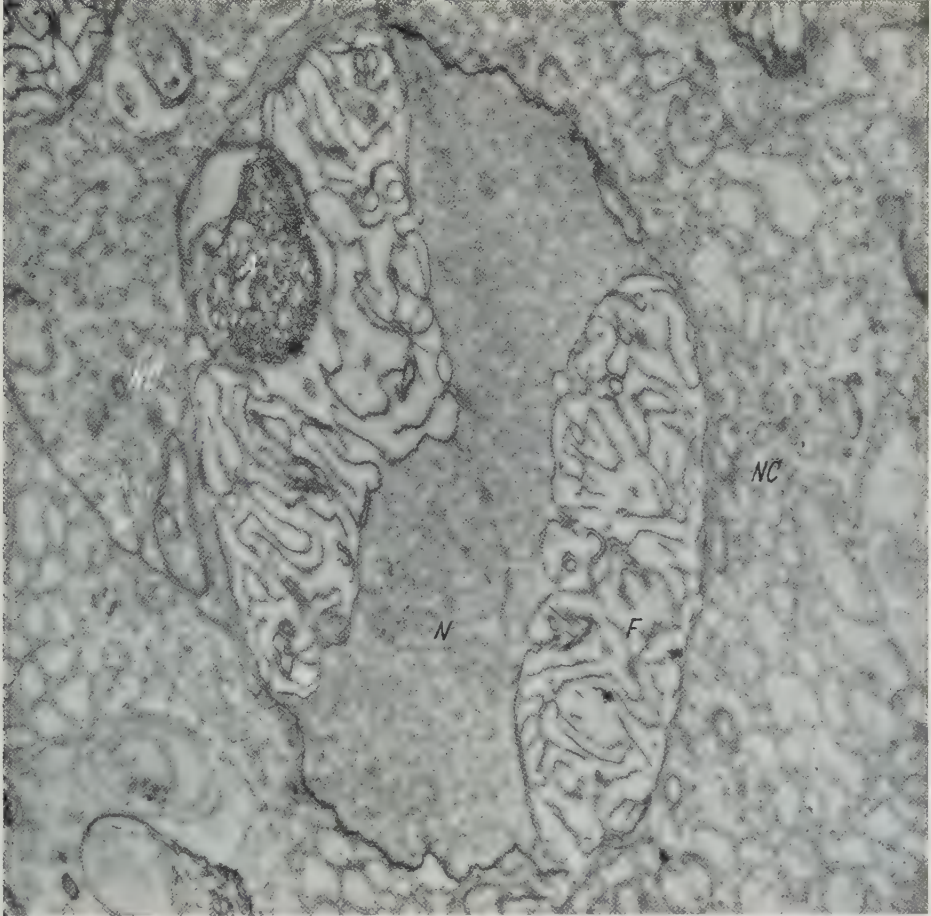


Fig. 8. A nearly mature sperm cell can be seen completely surrounded by nutritive cell processes (NC). The filamentous reticulum (F) occupies almost the entire cytoplasm. Some of these membranes appear to be in continuity with the membranes of the nuclear envelope. The nucleus (N) has not yet developed the arms typical of the mature sperm, while the acrosome (A) is shown in a transitory membrane filled stage. Magnification 14,750 \times

cells at this stage. The possibility of the origin of mitochondria from the nuclear envelope has been advanced in studies of ameba by BRANDT and PAPPAS (1959) and of rat lymphocyte and spermatocyte by HOFFMAN and GRIGG (1958). It is suggestive that although typical mitochondria are clearly visible in the early spermatid they are rarely seen in later stages and none are recognizable at the stages shown in Fig. 8 and 9. On the other hand, in Fig. 10, the densely packed lamellae do not resemble a mitochondrion but a tightly organized dictyosomal or Golgi complex.

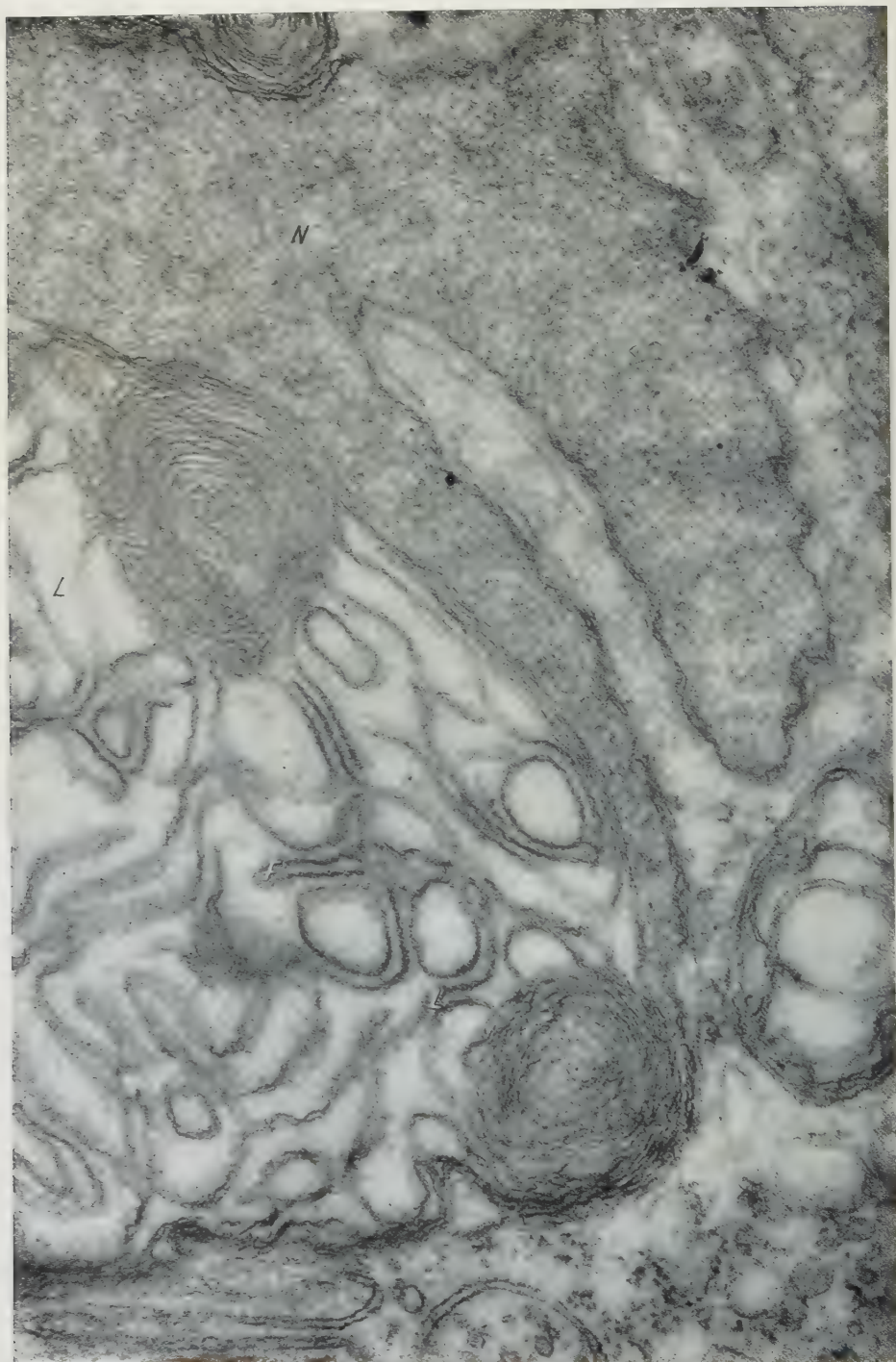


Fig. 9. Electron micrograph of a portion of the nucleus (N) and developing nuclear arms of a nearly mature sperm. Tightly packed concentric lamellar bodies (L) are shown in intimate relation with the membranes of the nuclear envelope as well as with the membranes of the filamentous reticulum (F). Magnification 56,000 \times

Numerous studies of the development of sperm have described profound changes in the membrane components of the cytoplasm (ITO 1960, FAWCETT and ITO 1958, YASUZUMI et al. 1960a, GATENBY and DALTON 1959). While in flagellate sperm the Golgi changes apparently dominate the reorganization of the

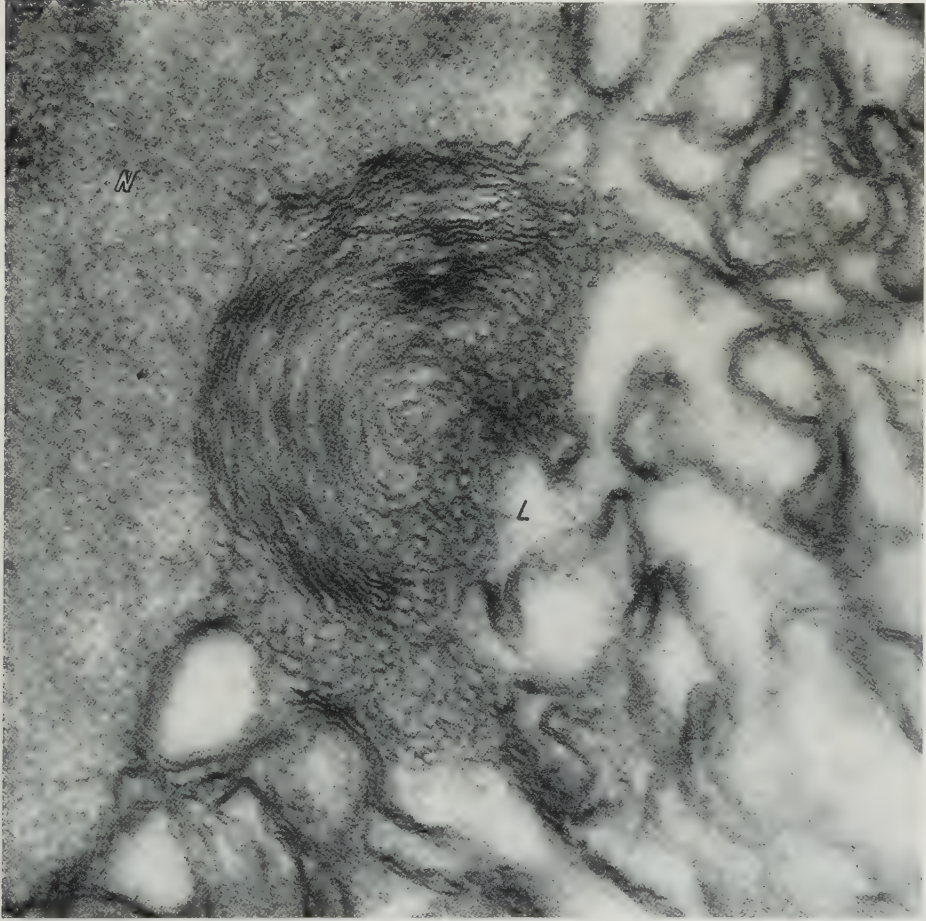


Fig. 10. Higher magnification of a lamellar body (L) in intimate contact with the nucleus (N). It is apparent that the lamellae are tightly packed vesicles resembling the Golgi complex of some cell types. Magnification 72,800 \times

cytoplasm (BURGOS and FAWCETT 1955, CLERMONT 1956), in the crayfish, the endoplasmic reticulum undergoes great differentiation. The basis of these membrane reorganizations may be in changes in the non-figured ground substance of the cytoplasm. The alterations in the membranes of the cytoplasm may not, therefore, be of primary significance. Nor, perhaps, does the grouping of these membranes in Golgi or agranular endoplasmic reticulum carry the same connotation as they do in somatic cells.

Summary

The form and differentiation of the endoplasmic reticulum has been studied in the developing sperm of the crayfish, *Cambaroides japonicus*. Throughout

development a relationship between the nuclear envelope and cytoplasmic portion of the endoplasmic reticulum has been shown to exist. Furthermore, large contributions of material from the nuclear envelope to extranuclear cytoplasmic systems has been noted in the development of early spermatids and nearly mature sperm.

A sequential predominance of several types of endoplasmic reticulum has been described in the differentiating sperm. An agranular vesicular reticulum is the most common in the early stages although annulate lamellar stacks and "rough" surfaced stacks are scattered randomly throughout the cytoplasm. Blebs of the nuclear envelope appear to contribute "rough" surfaced reticulum to the cytoplasmic system in the early spermatid. A fusion of vesicular elements results in the formation of the dense filamentous reticulum which is typical of the nearly mature sperm. Densely packed lamellae develop on the nuclear envelope in the maturing sperm and are connected to both the nuclear envelope and filamentous endoplasmic reticulum. The possible relationships of these lamellar groups to mitochondria or Golgi is discussed.

Literature

- ALLFREY, V. G., A. E. MIRSKY and H. STERN: The chemistry of the cell nucleus. *Advanc. Enzymol.* **16**, 411—500 (1955).
- BRACHET, J.: Recherches sur les interactions biochimiques entre le noyau et la cytoplasme chez les organismes unicellulaires. I. *Amoeba proteus*. *Biochim. biophys. Acta* **18**, 247—268 (1955).
- *Biochemical Cytology*, chap. VII and VIII. New York: Academic Press 1957.
- BRANDT, P. W., and G. D. PAPPAS: Mitochondria. II. The nuclear-mitochondrial relationship in *Pelomyxa carolinensis* Wilson (*Chaos chaos* L.). *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 91—96 (1959).
- BURGOS, M., and D. W. FAWCETT: Studies on the fine structure of the mammalian testis. I. Differentiation of the spermatids in the cat (*Felis domestica*). *J. biophys. biochem. Cytol.* **1**, 287—300 (1955).
- CALLAN, H. G., and S. G. TOMLIN: Experimental studies on amphibian oocyte nuclei. I. Investigation of the structure of the nuclear membrane by means of the electron microscope. *Proc. roy. Soc. B* **137**, 367—378 (1950).
- CLERMONT, Y.: The Golgi zone of the rat spermatid and its role in the formation of cytoplasmic vesicles. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, Suppl., 119—122 (1956).
- FAWCETT, D., and S. ITO: Observations on the cytoplasmic membranes of testicular cells, examined by phase contrast and electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 135—142 (1958).
- GATENBY, J. B., and A. J. DALTON: Spermiogenesis in *Lumbricus herculeus*. An electron microscope study. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 45—52 (1959).
- GOLDSTEIN, L., and W. PLAUT: Direct evidence for nuclear synthesis of cytoplasmic ribose nucleic acid. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **41**, 874—880 (1955).
- HOFFMAN, H., and G. W. GRIGG: An electron microscope study of mitochondria formation. *Exp. Cell Res.* **15**, 118—131 (1958).
- ITO, S.: The lamellar systems of cytoplasmic membranes in dividing spermatogenic cells of *Drosophila virilis*. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 433—442 (1960).
- MOSES, M. J.: Studies on nuclei using correlated cytochemical, light, and electron microscope techniques. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, 397—406 (1956).
- PALADE, G. E.: Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple disposition in cells in situ. *J. biophys. biochem. Cytol.* **1**, 567—582 (1955).
- The endoplasmic reticulum. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl., 85—97 (1956).
- PALAY, S. L., and G. E. PALADE: The fine structure of neurons. *J. biophys. biochem. Cytol.* **1**, 69—88 (1955).

- POLLISTER, A. W., M. GETTNER and R. WARD: Nucleocytoplasmic interchange in oocytes. *Science* **120**, 789 (Abstr.) (1954).
- PORTER, K. R.: The sarcoplasmic reticulum in muscle cells of *Amblystoma* larvae. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl., 163—173 (1956).
- Problems in the study of nuclear fine structure. IV. Internat. Kongr. für Elektronenmikrosk. **2**, 186—199 (1960).
- REBBUN, L. I.: Electron microscopy of basophilic structures of some invertebrate oocytes. I. Periodic lamellae and the nuclear envelope. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, 93—104 (1956).
- RUTHEMAN, A.: Basophilic lamellar systems in the crayfish spermatocyte. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 267—273 (1958).
- WATSON, M. L.: Pores in the mammalian nuclear membrane. *Biochim. biophys. Acta* **15**, 475—479 (1954).
- The nuclear envelope. Its structure and relation to cytoplasmic membranes. *J. biophys. biochem. Cytol.* **1**, 257—270 (1955).
- Staining of tissues for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 727—730 (1958).
- YASUZUMI, G., G. I. KAYE, G. D. PAPPAS, H. YAMAMOTO and I. TSUBO: Nuclear and cytoplasmic differentiation in developing sperm of *Cambaroides japonicus*. *Z. Zellforsch.* **53**, 141—148 (1960).
- H. TANAKA and O. TEZUKA: Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. VIII. Relation between the nutritive cells and the developing spermatids in a pond snail, *Cipangopaludina malleata*, Reeve. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 499—504 (1960a).

Professor G. D. PAPPAS, Columbia University, Dept. of Anatomy,
New York 32, N. Y. 630 West, 168th Street

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. R. DANNEEL)

DIE WIRKUNG VON RÖNTGENSTRAHLEN AUF DAS ZENTROPLASMA UND DIE CYTOSOMEN VON GEWEBEKULTURZELLEN*

Von

ERNST WENDT

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. September 1960)

Die Wirkung ionisierender Strahlen auf die Zelle und ihre Bestandteile kann, wie die Untersuchungen der letzten Jahre immer deutlicher gezeigt haben, am

ehesten durch Beobachtungen am lebenden Objekt geklärt werden. Da die technischen Voraussetzungen hierfür durch die Entwicklung der Gewebezüchtung, der Vitalfärbung, des Phasenkontrastmikroskops und der Mikrokinematographie gegeben sind, kommt es jetzt wohl in erster Linie darauf an, das Verhalten der einzelnen Kern- und Plasmastrukturen während und nach der Bestrahlung im Leben zu verfolgen und so die morphologischen Voraussetzungen für die spätere biochemische Analyse zu schaffen.

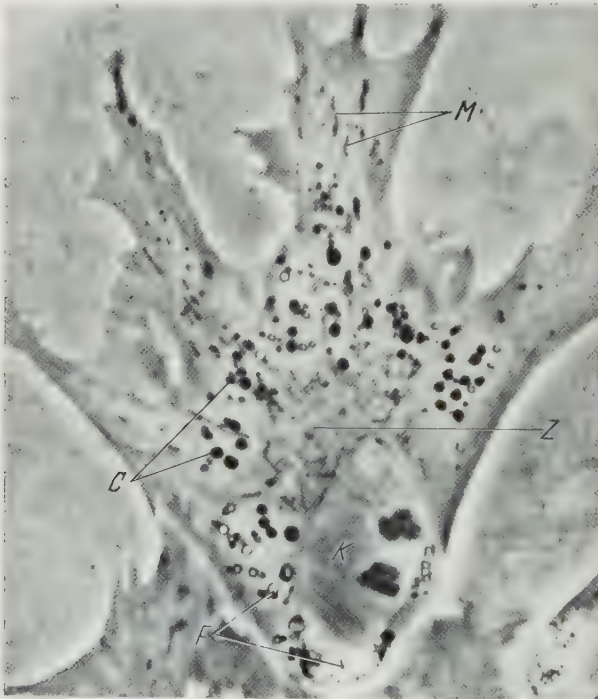


Abb. 1. Lebendaufnahme eines Hühnerherzfibroblasten in Gewebekultur. K Zellkern; Z Zentroplasma; M Mitochondrien; C Cytosomen; F Fettropfen (Vergr. 1080 ×)

Die vorliegende Arbeit handelt von der *Reaktion des Zentroplasmas und der Cytosomen*

auf Röntgenbestrahlungen. Als Zentroplasma (Abb. 1, Z) bezeichnet man die besonders strukturierte Cytoplasmazone, welche die Centriolen umgibt, während es sich bei den Cytosomen (Abb. 1, C) um kugelige Plasmagebilde handelt, die einen eigenartigen Formwechsel durchlaufen und eine komplizierte Innenstruktur aufweisen (BERNHARD et al. 1945, SCHULZ u. DE PAOLA 1958,

* Die Untersuchungen wurden mit Mitteln des Bundesministers für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft durchgeführt.

WEISSENFELS 1959). Über die Bedeutung der Cytosomen für den Stoffwechsel der Zelle ist bisher nichts bekannt. Die Gebilde sind osmierbar und lassen sich mit bestimmten Vitalfarbstoffen wie Nilblausulfat und Trimethylthionin selektiv anfärben (TANAKA 1933, HIRSCH und BRETSCHNEIDER 1937, TARAO 1940). Eine Färbung gelingt auch mit dem Perjodsäure-Schiff-Reagens (SCHULZ und DE PAOLA 1958).

Material und Methoden

Die Untersuchungen beziehen sich auf Lebendbeobachtungen an bestrahlten Herzfibroblasten und an Amnionepithelzellen von 8-tägigen Hühnerembryonen.

Die Explantate wurden zunächst in Rollertubes 7—8 Tage lang vorgezüchtet und dann in besondere Untersuchungskammern übertragen. Kulturmedium: Hühnerplasma, Embryonal-extrakt von 8-tägigen Leghornembryonen, menschliches Nabelschnurserum und physiologische Lösung nach PANNET und COMPTON (PC-Lösung). Versuchsgefäße: entweder hohlgeschliffene Objektträger nach MAXIMOW, oder die von WEISSENFELS (1958) beschriebenen Durchströmungskammern, die einen Wechsel des flüssigen Kulturmediums unter dem Mikroskop gestatten. Lebendbeobachtungen wurden an einem Ortholux-Mikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung durchgeführt, das in einen Hüllthermostaten (37°) eingebaut und mit einem Robot-Recorder verbunden ist. Letzterer wurde zur Herstellung von Serienaufnahmen an ein Zeitschaltwerk angeschlossen, welches in beliebig einstellbaren Zeitabständen den Kameraverschluß selbsttätig auslöst. Als Bestrahlungsgerät diente eine mit Berylliumfenster (Eigenfilterwert 1,6 mm Be) ausgerüstete Spektralanalysenröhre zum Röntgenapparat MG 150 der Firma Müller, Hamburg. Die Bestrahlungen erfolgten bei 40 kV, 10—20 mA, in 15 cm Abstand durch ein 0,6 mm dickes Aluminiumfilter (Halbwertschicht). Dabei wurden alle Kulturen durch das Deckglas der geschlossenen Kammer hindurch bestrahlt, damit sie steril blieben. Die Deckgläser waren 0,8 mm stark und wirkten wie eine zusätzliche Filterung durch 0,23 mm Aluminium.

Zur Identifizierung der Cytosomen verwendete ich die Vitalfarbstoffe Nilblausulfat und Trimethylthionin, die vor dem Gebrauch auf etwa das 200000fache mit physiologischer Lösung nach PANNET und COMPTON verdünnt wurden. Den Farbstoff Trimethylthionin gewinnt man am besten aus polychromem Methylenblau nach der Vorschrift von LASFARGUES u. DI FINE (1950). Dazu wird eine Lösung von Methylenblau in H₂O (2:1000) zunächst für 3—4 Tage zum „Altern“ im Thermostaten bei 60° gehalten und dann mit Äther (1:1) ausgeschüttelt. Dabei geht das Anhydrid des Trimethylthionins, welches für die Färbung wertlos ist (HARMS 1959) in den Äther über (Rotfärbung). Der wäßrige Rückstand wird mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt, wobei das Trimethylthionin in die Chloroformfraktion übergeht und diese blau färbt. Dampft man die Lösung ein, so erhält man das reine Trimethylthionin. Der Farbstoff wird zur Verwendung mit physiologischer Lösung verdünnt (die Lösung muß blau sein). Die Cytosomen färben sich dann rot an, zeigen also die Farbe des TMT-Anhydrids.

Aus der folgenden Tabelle kann man entnehmen, welche Strukturen von den einzelnen Farbstoffen angefärbt werden (+).

Tabelle

	Neutral- rot	Trypan- blau und Methylen- blau	Nilblau- sulfat	Chrysoidin	Tri- methyl- thionin	Diäthyl- safranin und Janusgrün
Externa der Cytosomen .	+	+	+	+	+	—
Interna der Cytosomen .	+	—	—	—	—	—
Innenkugeln d. Cytosomen	+	+	+	+	+	—
Kleine Cytosomen . . .	+	+	+	+	+	—
Erwachsene Mitochondrien	—	+	—	—	—	+
Junge Mitochondrien . .	+	+	—	—	—	+

Histochemische Reaktionen: Zum Nachweis von *Polysacchariden* benutzte ich Gewebekulturen, die zunächst in einem Gemisch aus neutralem Formol und physiologischer Lösung nach PANNET und COMPTON (1:10) fixiert und dann mit dem Perjodsäure-Schiff-Reagens (PAS-Reaktion) nach HOTCHKISS gefärbt wurden. Die Darstellung von *Esterphosphatiden* gelang mit der von MENSCHICK ausgearbeiteten Nilblaureaktion bei Kulturen, die mit Formolcalcium nach BAKER fixiert waren.

A. Cytosomen

I. Die Cytosomen der normalen Zelle. In lebenden Fibroblasten- oder Amnion-epithelzellen (Abb. 1) sieht man mit dem Phasenkontrastmikroskop außer dem Zellkern (*K*), dem Zentroplasma (*Z*), den Mitochondrien (*M*) und den Fetttropfen (*F*) eine große Anzahl kontrastreicher kugelförmiger Gebilde, die *Cytosomen* (*C*).

Die Cytosomen, die in der Literatur auch als „Golgi-Körper“ beschrieben sind, und deren Durchmesser zwischen $0,6$ und 5μ liegt, wandern mit dem Plasmastrom im Zellkörper umher, gelangen aber nie in das Zentroplasma, dessen größere Dichte sie wohl vom Eindringen abhält.

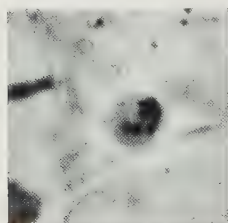


Abb. 2. Cytosom mit mehreren kontrastreichen Unterkugeln. (Lebendaufnahme, Phasenkontrast, Vergr. $1500\times$)

Die Cytosomen sind elektronenoptisch an ihren lamellären *Innenstrukturen* sofort zu erkennen (WEISSENFELS 1959), lassen sich aber mit Hilfe von Vitalfarbstoffen (TMT, Nilblausulfat, Chrysoidin) auch unter dem Lichtmikroskop leicht identifizieren. Außerdem werden sie in OsO_4 -haltigen Fixierungsgemischen tief schwarz. Nach Formolfixierung (1%ige Lösung in PC) bleiben sie gut erhalten und können mit Sudan-Schwarz B angefärbt werden, sind also fetthaltig.

Bei längerer Beobachtung mit dem Phasenkontrastmikroskop läßt sich der *Formwechsel* der Cytosomen gut verfolgen: In jungen Zellen ist die Mehrzahl der Cytosomen noch klein. Diese Kügelchen, deren Durchmesser etwa $0,6$ – 1μ beträgt, sind sehr kontrastreich und erscheinen im Phasenkontrastmikroskop schwarz. Da sie sich mit den Vitalfarbstoffen Trimethylthionin, Nilblausulfat sowie mit Sudan-Schwarz (nach Fixierung) kräftig anfärben, dürften sie in diesem Stadium hauptsächlich aus Lipoiden bestehen.

Die kleinen Cytosomen wachsen dann im Laufe von 20–25 Std bis zur Größe von 2 – 3μ an. Wie die mikroskopische Betrachtung lehrt, bestehen sie nun aus 2 Komponenten mit verschiedenen optischen Eigenschaften, einem hellen, kontrastarmen *Innenkörper*, dem *Internum*, und einer dunkleren *Hülle*, dem *Externum*.

In den nächsten 5–10 Std vergrößern sich die Cytosomen auf 4 – 5μ . Dabei nehmen die Interna an Volumen zu, wohingegen sich die Substanz der Externa nicht wesentlich vermehrt. Bei großen Cytosomen sind daher die Externa als dünne Häute über die prallgefüllten Innenkörper gespannt.

In den stark entwickelten Interna erscheinen zunächst einzelne, später zahlreiche, sehr kontrastreiche Unterkugeln (Abb. 2), deren Durchmesser $0,6$ – $0,8\mu$ beträgt. Diese kleinen Unterkugeln treten, wie man bei fortgesetzter Lebendbeobachtung deutlich sehen kann, nach einiger Zeit aus den Cytosomen aus und gelangen in das Cytoplasma. Hier durchwandern sie mit dem Plasmastrom den

Zellraum und wachsen dabei allmählich wieder zu größeren Cytosomen an, aus denen schließlich eine neue Generation von Unterkugeln entlassen wird.

Bei der Vitalfärbung werden die Externa der Cytosomen besonders stark angefärbt, während die Innenkörper fast oder ganz farblos bleiben. Die beiden Komponenten besitzen also eine verschiedene chemische Zusammensetzung. Näheren Aufschluß hierüber lieferten die Ergebnisse der histochemischen Untersuchungen.

Dabei wandte ich unter anderem die PAS-Reaktion nach HOTCHKISS an. Hierzu wurden die Gewebekulturen in einem Gemisch aus neutralem Formol

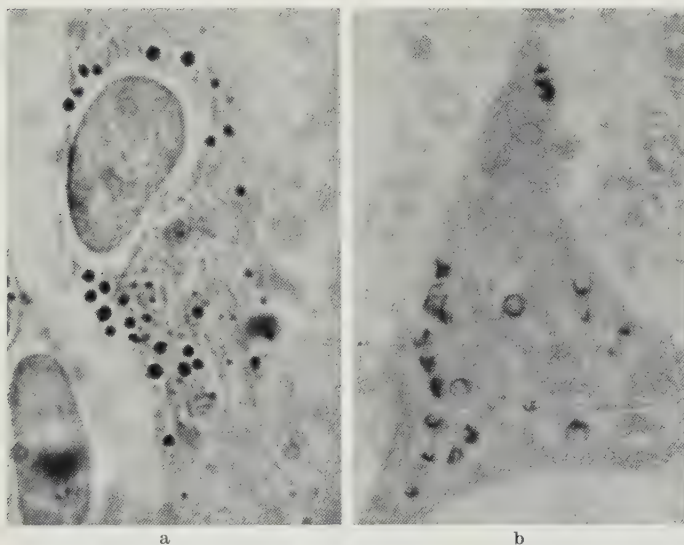
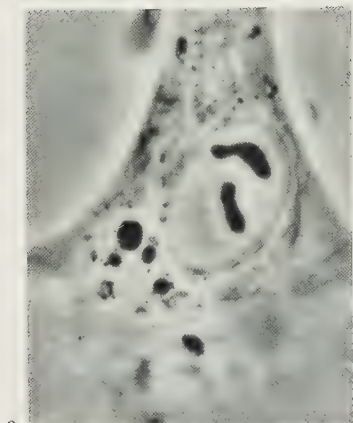


Abb. 3 a u. b. Hühnerherzfibroblast nach Behandlung mit dem Perjodsäure-Schiff-Reagens (HOTCHKISS). Nur die Cytosomen zeigen positive Reaktion. (Fixierung: Neutrales Formol und PC-Lösung 1:10, Vergr. 975 \times .) b Ein mit der Nilblaureaktion nach MENSCHICK gefärbter Fibroblast. Nur die Externa der Cytosomen haben den Farbstoff angenommen. (Fixierung: Formol-Calcium nach BAKER, Vergr. 975 \times)

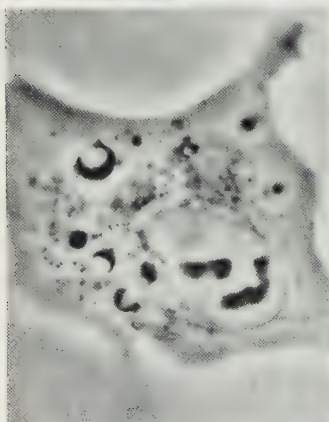
und PC-Lösung (1:10) fixiert, gründlich ausgewaschen und anschließend für 48 Std bei 40° in 96%igen Alkohol gebracht. Der Alkohol verhindert einerseits das Auftreten der Plasmalreaktion und wäscht andererseits alle fetthaltigen Bestandteile, insbesondere die Externa der Cytosomen, aus, so daß nur die *Innenkörper* der Cytosomen übrigbleiben, die sich bei der PAS-Reaktion anfärben, d. h. aus *Polysacchariden* bestehen. Man sieht dies deutlich auf Abb. 3a (Hellfeldaufnahme eines Fibroblasten nach der PAS-Färbung).

Die Substanz der Externa läßt sich mit der Nilblau-Reaktion nach MENSCHICK identifizieren. Hierzu wurden Kulturen mit Formolcalcium nach BAKER 4 Std lang fixiert, dann gespült und 90 min lang bei 60° in einer gesättigten Nilblausulfatlösung gefärbt. Dann wurden die Präparate für 30 min bei 50° in Aceton eingelegt, darauf 30 min lang in 5%ige Essigsäure und schließlich in 5%ige Salzsäure. Anschließend wurde gespült und in Glyceringelatine eingebettet.

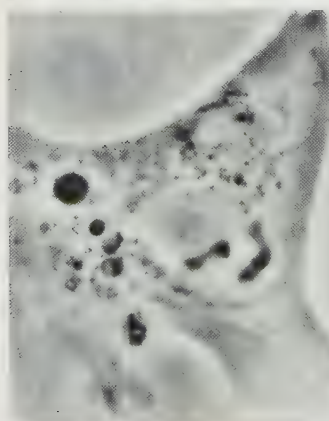
Diese Färbung beruht nach LIPP (1958) auf der Eigenschaft der Nilblausulfatlösung mit Fetten, insbesondere mit Esterphosphatiden, stabile blaue oder blaugüne Verbindungen zu bilden. Dieser Nilblau-Esterphosphatidkomplex ist



a



b



c

Abb. 4a—c. Lebendaufnahme einer Zelle mit 4 Cytosomen (Phasenkontrast, Vergr. 750 \times). a Vor der Bestrahlung, b 1 Std nach der Bestrahlung, c 2 Std nach der Bestrahlung. Die abgelösten Externa haben sich wieder über die Interna geschoben

unlöslich in Aceton und widersteht auch verdünnter Essig- und Salzsäure. Die auf die Nilblaufärbung folgende Extraktion mit Aceton löst also alle anderen Fettstoffe aus den Präparaten, während die Differenzierung mit verdünnten Säuren das von den Nichtlipiden gebundene Nilblau vollständig auszieht.

Die *Externa der Cytosomen* wurden bei dieser Färbung blau oder blaugrün, während alle anderen Zellbestandteile farblos blieben (Abb. 3b). Hieraus folgt, daß die *Externa der Cytosomen* vorwiegend oder nur aus *Esterphosphatiden* bestehen.

II. Das Verhalten der Cytosomen nach Röntgenbestrahlung. a) *Kontraktion der Externa.* Die *Interna der Cytosomen* sind im Phasenkontrastmikroskop in der Regel nicht sichtbar, weil sie von den kontrastreichereren *Externa* umgeben sind, die den Einblick in das Innere der Cytosomen verhindern. Bestrahlt man jedoch Hühnerherzfibroblasten mit reifen Cytosomen, die noch keine Unterkugeln enthalten, mit 600 bis 800 r (40 kV), so ziehen sich die *Externa* zusammen und legen die Innenkörper teilweise frei. Eine solche Ablösung der *Externa* zeigen die Abb. 4a—c. Es handelt sich um Phasenkontrastbilder einer lebenden Zelle, die unmittelbar vor der Bestrahlung (Abb. 4a), 1 Std (Abb. 4b) und 2 Std (Abb. 4c) nach der Bestrahlung aufgenommen wurde. Im Cytoplasma der Zelle liegen rechts neben dem Kern 4 Cytosomen, die im Phasenkontrastmikroskop als homogene, dunkle Kugeln erscheinen. Infolge der Bestrahlung haben sich, wie Abb. 4b erkennen läßt, die *Externa* der größeren Cytosomen kontrahiert und bedecken jetzt nur noch einen Teil der nunmehr deutlich erkennbaren Innenkörper, die bei den großen Cytosomen das Externumaterial an Volumen um ein Vielfaches übertreffen.

Die *Kontraktion der Externa* ist, wie Abb. 4c zeigt, ein reversibler Vorgang. Die *Externa* schieben sich wieder über die Innenkörper. Bei dem einen Cytosom ist dieser Vorgang schon beendet, während er bei zwei anderen gerade beginnt.

Bei normalen Fibroblastenzellen habe ich Vorgänge dieser Art nie beobachtet. Warum sie nach Röntgenbestrahlung auftreten, läßt sich vorläufig noch nicht erklären.

b) *Beschleunigte Bildung und Ausstoßen von „Unterkugeln“*. Reife Cytosomen enthalten, wie gesagt, in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien eine mehr oder weniger große Anzahl von kontrastreichen „Unterkugeln“, die sich mit Nilblausulfat, Trimethylthionin und Chrysoidin anfärben lassen, d.h. die gleiche stoffliche Zusammensetzung haben wie die Externa.

Bestrahlt man nun Zellen, deren Cytosome zwar schon stark herangewachsen sind, aber noch keine oder nur wenige Untereinheiten enthalten mit 400—500 r, so kann man bei Lebendbeobachtungen verfolgen, wie schon nach kurzer Zeit (20—40 min) Binnenkugeln im Innern der Cytosomen auftreten. Ihre Anzahl steigt schnell an, bis sie schließlich das Internum vollständig füllen.

Abb. 5a zeigt zunächst ein Cytosom, das vor der Bestrahlung aufgenommen wurde und nur wenige kontrastreiche Unterkugeln enthält. Auf der Abb. 5b sieht man das gleiche Cytosom 30 min nach der Bestrahlung und

erkennt deutlich, daß sich die Anzahl der Kugeln stark vermehrt hat. Die Entstehung dieser Untereinheiten konnte ich allerdings wegen ihrer geringen Größe nicht genau verfolgen, nehme aber auf Grund ihrer Färbbarkeit an, daß sie von den Externa nach innen abgeschnürt werden.

Die nach der Bestrahlung entstandenen *Unterkugeln* treten nach einiger Zeit in das *Hyaloplasma* aus, wobei sie die Schicht des Externums durchwandern. Die Kugeln bleiben noch eine Zeitlang durch dünne Brücken (Abb. 5b) mit dem Externum verbunden. Erst wenn diese fadenförmige Verbindung zerreißt, werden sie vom Plasmastrom abgeführt. Nach dem Austritt der Unterkugeln schwinden die Cytosomen allmählich dahin, bis nur noch ein kleiner Restkörper übrigbleibt, der hauptsächlich aus Externummateriale besteht und keine weiteren Kugeln mehr abstößt.

Abb. 6 zeigt ein anderes Cytosom aus einer bestrahlten Amnionepithelzelle, das mit Nilblausulfat vital angefärbt wurde, nachdem sich die Unterkugeln durch die Strahlenwirkung vermehrt hatten. Man sieht an der Peripherie deutlich die austretenden Binnenkörper, die sich dunkelblau angefärbt haben. In der Mitte des Cytosoms scheint noch das helle Internum durch.

c) *Zerfall der Cytosomen*. Die kleineren Cytosomen (Durchmesser etwa 3μ), deren Interna noch unterentwickelt sind und die auch in der Regel noch keine Unterkugeln enthalten, zerfallen nach stärkerer Bestrahlung (1500 r) ausnahmslos schon nach kurzer Zeit in kleine Teilstücke, die keinen Restkörper zurücklassen.

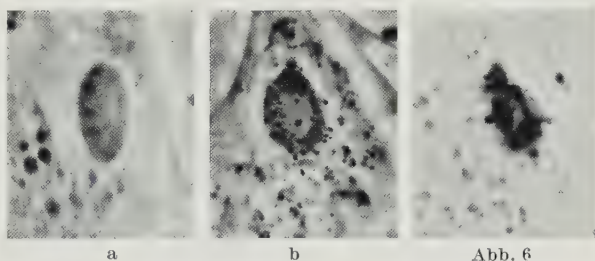


Abb. 5a u. b. Lebendaufnahme eines Cytosoms vor (a) und 30 min nach (b) einer Bestrahlung mit 500 r. Die vor der Bestrahlung nur spärlich vorhandenen Unterkugeln des Cytosoms haben sich vermehrt und treten aus dem Cytosom aus. (Phasenkontrast, Vergr. 1600 \times)

Abb. 6. Lebendaufnahme eines bestrahlten Cytosoms nach Vitalfärbung mit Nilblausulfat (Hellfeld, Vergr. 1600 \times)

Auf den Abb. 7a und b sieht man eine Zelle, die vor und nach der Bestrahlung im Phasenkontrastmikroskop photographiert wurde. Im unbestrahlten Zustand (Abb. 7a) enthielt die Zelle etwa 14 Cytosomen mittlerer Größe und daneben eine Anzahl kleiner, junger Cytosomen, die sich als schwarze Kügelchen deutlich von ihrer Umgebung abheben. Die Abb. 7b zeigt dieselbe Zelle 50 min

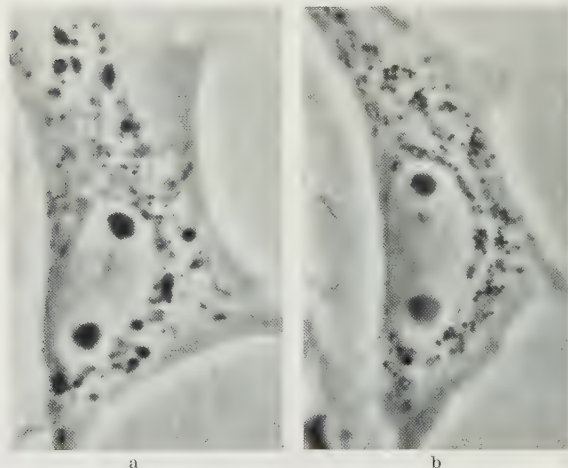


Abb. 7a u. b. Hühnerherzfibroblasten vor (a) und nach einer Bestrahlung mit 1500 r (b). Etwa 50 min nach der Bestrahlung sind alle Cytosomen der Zelle in kleinere Teilstücke zerfallen. (Phasenkontrast, Vergr. 1150 \times)

nach der Bestrahlung; sie enthält nur noch kleine, kugelförmige Zerfallsprodukte der Cytosomen.

Diesen Zerfall der Cytosomen kann man mit dem Mikroskop in der lebenden Zelle leicht verfolgen (Abb. 8a bis c). Dabei zeigt sich, daß die entstandenen Bruchstücke in Form von Kugeln einzeln oder zu mehreren ins Plasma austreten. Manchmal zerfällt ein Cytosom aber auch schlagartig in viele Teilstücke. In allen diesen Fällen fällt auf, daß die Zerfallsprodukte stets denselben Durchmesser besitzen

(etwa 0,8 μ) und hinsichtlich ihrer Größe mit den Unterkugeln übereinstimmen, die normalerweise von den reifen Cytosomen entlassen werden.

Die Abb. 8a—c liefern Beispiele für den verschiedenartigen Verlauf des Vorganges. Im Falle der Abb. 8a und b wird die Substanz in Portionen abgeschnürt, die noch eine Zeitlang perlschnurartig zusammenhängen und sich erst später ganz von dem Cytosom abtrennen, dessen Restkörper dann neue Fortsätze ausbilden kann. Andere Cytosomen (Abb. 8c) zerfallen mit einem Male in viele kugelige



Abb. 8a—c. Durch Strahlenwirkung zerfallende Cytosomen. (Etwa 1200 r, Lebendaufnahmen, Phasenkontrast, Vergr. 1660 \times .) Nähere Angaben im Text

Teilstücke ohne vorher Ausläufer gebildet zu haben. Die Zerfallsprodukte bleiben noch einige Zeit traubenartig beisammen und verteilen sich dann im Zellraum.

Um Auskunft über das weitere Schicksal der Zerfallsprodukte zu erhalten, verfolgte ich die bestrahlten Zellen noch weitere 15—20 Std lang im Phasenkontrastmikroskop. Dabei stellte sich heraus, daß die durch Strahlenwirkung entstandenen Teilkugeln wieder zu größeren Cytosomen heranwachsen können.

Abb. 9a zeigt eine Zelle 3 Std nach der Bestrahlung. Der Kern ist leicht angeschwollen und seine Nukleolen haben sich aufgelockert. Große Cytosomen sind nicht mehr vorhanden; das Plasma enthält statt dessen viele kontrastreiche Zerfallskugeln. Auf dem 5 Std später aufgenommenen Bild (Abb. 9b) ist deutlich zu sehen, daß sich die Zelle von der Bestrahlung wieder erholt hat. Die

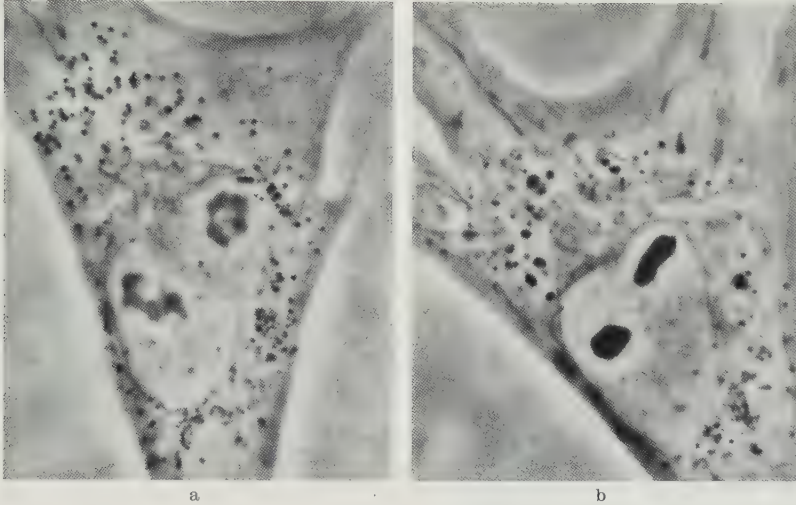


Abb. 9a u. b. Fibroblastenzelle 3 Std (a) und 5 Std (b) nach einer Bestrahlung mit 1200 r (Lebendaufnahmen, Phasenkontrast, Vergr. 1000 \times). Die durch die Strahlenwirkung entstandenen Zerfallsprodukte der Cytosomen wachsen wieder zu größeren Kugeln heran

Kernschwellung ist abgeklungen, die Nukleolen sind wieder kompakt und kontrastreich, und im Cytoplasma erkennt man Cytosomen mittlerer Größe, die aus den kleinen Kugeln entstanden sind.

B. Zentroplasma

I. Das Zentroplasma der unbestrahlten Zelle. Das Zentroplasma ist in der normalen Fibroblastenzelle als annähernd kreisrunde Region leicht zu erkennen (Abb. 10). Etwa in seiner Mitte liegen die Zentriolen, die man in lebenden Zellen wegen ihrer ungünstigen optischen Eigenschaften schlecht sieht, die jedoch nach entsprechender Fixierung und Färbung deutlich als Diplosom hervortreten.

Das Zentroplasma befindet sich stets in Kernnähe und liegt gewöhnlich der Kernmembran an einer Stelle an. Es ist wesentlich kontrastreicher als das Hyaloplasma und erscheint im Phasenkontrastmikroskop *fein gekörnt und wabig strukturiert*. Geformte Plasmabestandteile, wie etwa Mitochondrien oder Cytosomen, vermögen in das dichte Zentroplasma nicht einzudringen und liegen daher oft ringartig um das Zentroplasma herum.

II. Strahlenbedingte Veränderungen des Zentroplasmas. Bestrahlt man eine Fibroblastenkultur mit 600—1000 r (40 kV), so treten nach einem Intervall von 3—5 Std im Zentroplasma vieler Zellen *Vakuolen* auf.

Vakuolenbildung nach Bestrahlung ist schon mehrfach beobachtet worden. So hat WOLF (1940) die Bildung von Vakuolen im Zellkern von Karzinomzellen

und ihren späteren Austritt in das Plasma beschrieben. Auch VOLLMAR (1939) fand eine strahlenbedingte Vakuolenbildung im Hyaloplasma. Nach HEILBRUNN (1928, 1958) sollen die Vakuolen aus geschädigtem Plasma, ausgeflockten Eiweißen oder wäßrigen Flüssigkeiten bestehen.

Abb. 11a zeigt eine zweikernige Zelle, die 2 Std nach einer Bestrahlung mit 600 r photographiert wurde. Über den Kernen sieht man das Zentroplasma, das von vielen Mitochondrien und Cytosomen umgeben ist. Beim Vergleich mit dem Zentroplasma einer Normalzelle fällt auf, daß die wabige Struktur einem homogenen, milchig trüben Aussehen Platz gemacht hat. Man erkennt auch schon im Zentroplasma einige kleine Vakuolen, wie man sie in der unbestrahlten Zelle nie antrifft.

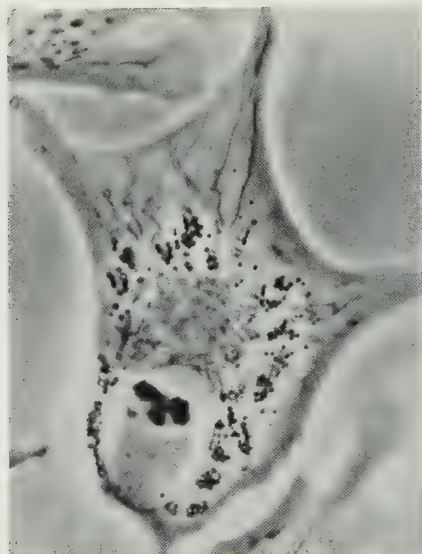


Abb. 10. Lebendaufnahme einer Normalzelle (Phasenkontrast, Vergr. 700 \times). Das Zentroplasma (oberhalb des Kerns) ist an seiner wabigen Struktur und feinen Körnelung zu erkennen

Diese Vakuolenbildung kann man bei der lebenden Zelle sehr gut verfolgen. Dabei hellt sich das Zentroplasma zunächst an mehreren engbegrenzten Stellen merklich auf und wird dünnflüssiger. Innerhalb dieser hellen Bezirke bilden sich dann kleine Flüssigkeitstropfen, die allmählich anschwellen. Das an die Tropfen angrenzende Zentroplasma wird kontrastreicher, verdichtet sich also. Die auf etwa 1—1,5 μ herangewachsenen Vakuolen lösen sich später von ihrer Ursprungsstelle ab und wandern dann im Zentroplasma umher.

Der Umfang der Flüssigkeitsabscheidung richtet sich nach der Höhe der verabreichten Strahlenmenge. Bei Dosen unter 300 r treten im Zentroplasma noch keine Tropfen auf. Steigert man die Dosis von 500 r bis 1500 r, so nimmt

die Anzahl der Vakuolen zu. Überschreitet man aber 3000 r, so bleibt dieser Strahleneffekt wieder ganz aus. Vermutlich treten in diesem Falle tiefergreifende Schäden auf, die eine Vakuolenbildung unmöglich machen. Mit steigender Dosis nimmt ferner merkwürdigerweise die Latenzzeit zu. So treten nach einer Bestrahlung mit 500 r die ersten Tropfen schon nach 3—5 Std auf, während sie nach Verabreichung von 2000 r erst nach 10—15 Std erscheinen.

Bei der in Abb. 11 b abgebildeten Zelle ist die Vakuolenbildung schon sehr weit fortgeschritten, doch sieht man in der Mitte des Zentroplasmas einen dunklen Restbezirk, der keine Bläschen enthält und in dessen Mittelpunkt man auch bei der Lebendbeobachtung die Zentriolen als kleine, sehr kontrastreiche Körperchen sehen konnte. Die Plasmazone, in der die Zentriolen liegen, verhält sich also anders als das übrige Zentroplasma.

Die Frage nach der *stofflichen Zusammensetzung der Vakuolen* konnte ich bislang nicht klären. Weder mit Trypanblau noch mit Neutralrot, Methylenblau, Trimethylthionin, Nilblausulfat, Chrysoidin, Diäthylsafranin und Janusgrün

gelang eine Anfärbung des Vakuoleninhaltes. Ebenso negativ blieb die Xanthoproteinreaktion bei formolfixierten Gewebekulturen und die Färbung mit Sudan III, Sudan-Schwarz B und Oxacin.

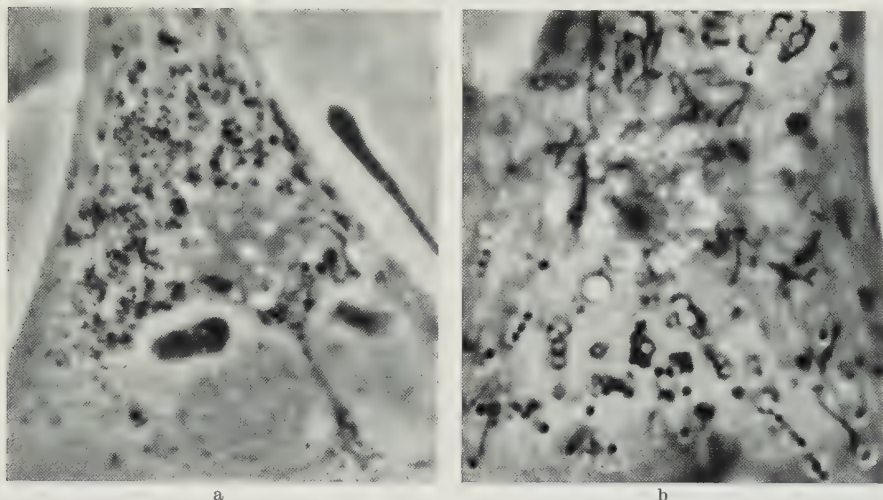


Abb. 11 a u. b. Ausschnittbilder von zwei bestrahlten Zellen (Lebendaufnahmen, Phasenkontrast, 600 r, Vergr. 1080 \times). a Das Zentroplasma sieht homogen aus und enthält mehrere Flüssigkeitsbläschen. b Die Vakuolenbildung ist weiter fortgeschritten, im Bereich der Zentriolen erfolgt keine Flüssigkeitsabscheidung

Da die schädigende Wirkung ionisierender Strahlen unter anderem auf der Bildung von H_2O_2 beruhen soll, verwandte ich besondere Sorgfalt auf den Nachweis von Peroxyden und Peroxydasen mit Hyposulfitweiß und Rongalitweiß (für H_2O_2), bzw. die Peroxydasereaktion nach LISON und KREIBISCH. Aber auch hierbei traten im Zentroplasma nirgends Farbniederschläge auf.

Nach allen diesen Fehlschlägen liegt die Vermutung nahe, daß die Vakuolen Wasser enthalten, das bei strahlenbedingten Entquellungsvorgängen vom Zentroplasma ausgeschieden wird. Eine Entquellung und Wasserabscheidung des Plasmas wurde in der Literatur jedenfalls schon mehrfach beschrieben (WILLIAMS, 1925, HEILBRUNN 1958). In neuerer Zeit konnten ferner WOHLFAHRT-BOTTERMANN und SCHNEIDER (1958) bei *Paramecium* eine Sol-Gel-Umwandlung des Cytoplasmas nach Röntgenbestrahlung beobachten.

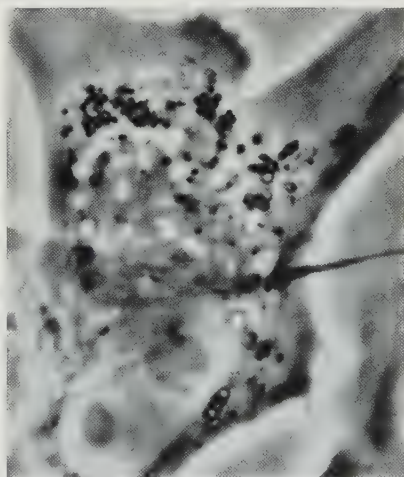


Abb. 12. Lebendaufnahme einer mit 600 r bestrahlten Zelle. Die im Zentroplasma gebildeten Vakuolen dringen in das Cytoplasma ein. (Phasenkontrast, Vergr. 960 \times)

Die im Zentroplasma bestrahlter Zellen entstandenen Vakuolen wandern, wie ich nun weiter beobachten konnte, an den Rand dieses Plasmabezirkes und verlassen ihn, um in das Hyaloplasma überzutreten (Abb. 12).

Im Zellraum verschmelzen dann zwei oder mehrere kleine Vakuolen zu größeren Blasen, die sich wiederum mit anderen verbinden können. So entstehen in der Regel 2—4 große Vakuolen, die den Kern umgeben und deren Durchmesser 8—10 μ betragen kann.

Bei diesem Zusammenschluß der kleineren Flüssigkeitsblasen zu den großen Vakuolen werden oft Bestandteile des Cytoplasmas, wie Mitochondrien, Cytoplasten und auch Fetttropfen in das Innere der Vakuolen eingeschwemmt und ballen sich hier zu dichten Knäueln zusammen.

Im Cytoplasma der in Abb. 13a dargestellten Zelle sieht man drei große Vakuolen, die nur durch eine dünne plasmatische Scheidewand voneinander getrennt waren, sich aber auch später nicht miteinander verbunden. Das oberhalb des Kernes liegende Zentroplasma hat zu diesem Zeitpunkt die Flüssigkeitsabsonderung schon wieder eingestellt.

Etwa 3—4 Std nach ihrer Entstehung werden diese großen Vakuolen *allmählich resorbiert* (Abb. 13b). Dabei entstehen an ihrem Rande kleine Kanälchen, die ins Cytoplasma hineinragen und deren Inhalt sich ins Plasma ergießt. Während dieses Entleerungsvorgangs stülpen sich die Wandungen der Vakuolen stellenweise in das Lumen ein. Die so entstandenen Einwölbungen gleichen sich aber nach einiger Zeit unter gleichzeitiger Verkleinerung des Innenraumes wieder aus. Dieser Vorgang wiederholt sich periodisch bis alle Flüssigkeit vom Plasma aufgenommen, die Vakuolen also entleert sind. Damit gewinnt die Zelle wieder ihr normales Aussehen (Abb. 13c), und morphologisch bleibt kein Strahlenschaden zurück.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit handelt von strahlenbedingten morphologischen Veränderungen an den Cytosomen und am Zentroplasma von Hühnerherzfibroblasten

und Amnionepithelzellen in Gewebekultur. Die dabei ablaufenden biochemischen Vorgänge sind unbekannt und werden daher hier nicht diskutiert.

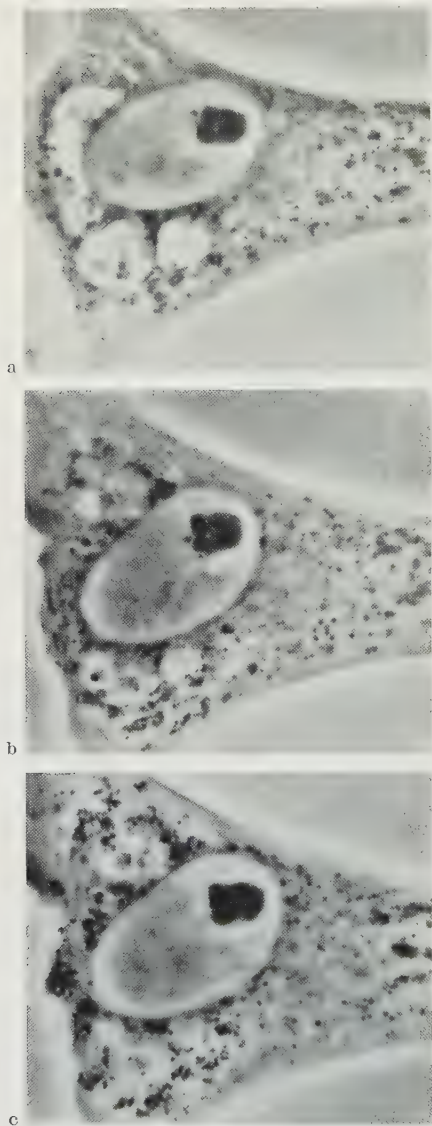


Abb. 13 a—c. Lebendaufnahmen einer mit 700 r bestrahlten Zelle (Phasenkontrast, Vergr. 960 \times). a Die aus dem Zentroplasma stammenden Bläschen haben sich zu drei großen Vakuolen vereinigt. Das Zentroplasma hat die Flüssigkeitsabsonderung inzwischen wieder eingestellt. b Die Vakuolen lösen sich allmählich auf und sind (c) nach etwa 3 Std verschwunden

A. Cytosomen

Die Cytosomen der normalen Fibroblastenzelle sind $0,6\text{--}5\mu$ große kugelige Plasmaeinschlüsse, die sich im Leben mit den Vitalfarbstoffen Trimethylthionin, Nilblausulfat und Chrysoidin selektiv anfärben lassen. Sie setzen sich aus zwei Komponenten zusammen: einer Außenhülle, dem Externum, das einen kompakten Innenkörper, das Internum schalenartig umschließt. Die Substanz des Externums besteht seinem histochemischen Verhalten nach vorwiegend aus Esterphosphatiden, die des Internums aus Polysacchariden.

Die Interna der größeren Cytosomen enthalten in der Regel einige etwa $0,6\mu$ große Unterkugeln, die wie die Externa aus Esterphosphatiden zu bestehen scheinen. Diese Unterkugeln treten aus den Cytosomen aus und gelangen in das Hyaloplasma. Hier durchlaufen sie ein Größenwachstum und bilden später in ihrem Inneren eine neue Generation von Untereinheiten.

Bei der Behandlung mit Röntgenstrahlen treten an den Cytosomen bestimmte morphologische Veränderungen auf, die sich an der lebenden Zelle gut beobachten lassen.

1. Nach einer Bestrahlung mit $600\text{--}800$ r ziehen sich die Externa der größeren Cytosomen (Durchmesser etwa 4μ) vielfach zusammen, so daß die Innenkörper freigelegt werden. Bei den kleineren Cytosomen tritt diese Veränderung nicht ein. Dieser Strahleneffekt ist reversibel.

2. Bestrahlt man Zellen, deren Cytosomen zwar schon sehr weit entwickelt sind, aber noch keine oder erst wenige Unterkugeln enthalten, mit $300\text{--}500$ r, dann erfolgt eine vorzeitige Bildung solcher Untereinheiten. Ihre Anzahl nimmt dann rasch zu, bis die Interna vollständig von ihnen erfüllt sind. Die neugebildeten Unterkugeln treten später aus den Cytosomen aus und verteilen sich im Hyaloplasma. In diesem Falle besteht die Strahlenwirkung also in der Stimulierung eines normalerweise langsamer ablaufenden Prozesses.

3. Verwendet man höhere Dosen ($1000\text{--}1500$ r), so zerfallen die Cytosomen nach kurzer Zeit in eine Vielzahl kleiner Teilstücke, die im Laufe weiterer 4 bis 7 Std wieder zu größeren, normal aussehenden Cytosomen heranwachsen.

B. Zentroplasma

Im normalen Hühnerherzfibroblasten liegt das Zentroplasma stets in der Nähe des Zellkerns und ist im Phasenkontrastmikroskop an seiner dichten, wabigen Struktur zu erkennen. In seiner Mitte liegen die Zentriolen.

Zwei Stunden nach der Bestrahlung mit $600\text{--}1000$ r treten im Zentroplasma Vakuolen auf, die allmählich bis zur Größe von $1,5\mu$ heranwachsen und wahrscheinlich Wasser enthalten, das durch Entquellungs Vorgänge vom Zentroplasma abgeschieden wird. Die Tropfen durchwandern das Zentroplasma und treten in das Hyaloplasma über. Hier verschmelzen sie miteinander zu größeren Vakuolen, die im weiteren Verlauf der Erholungsphase wieder verschwinden, wobei die Flüssigkeit vom Cytoplasma resorbiert wird.

Der Umfang der Flüssigkeitsabscheidung im Zentroplasma hängt von der verabreichten Strahlendosis ab. Bei 300 r treten noch keine Vakuolen auf, wohl aber in zunehmendem Maße, wenn man $500\text{--}1000$ r verabfolgt. Bei Bestrahlung mit 3000 r und mehr bleibt dieser Effekt wieder völlig aus.

Mit steigender Dosis ändert sich ferner die Dauer der Latenzzeit. So treten nach der Bestrahlung mit 500 r die Flüssigkeitsansammlungen schon nach 3 bis 5 Stdn auf, während sie nach Verabreichung von 2000 r erst nach 10—15 Stdn erscheinen.

Die Vakuolenbildung ist natürlich nur durch eine gerichtete Transportleistung des Cytoplasmas möglich und kann auch nur erfolgen, solange der Zelle noch die hierzu erforderlichen energieliefernden Prozesse zur Verfügung stehen. Hierauf beruht wahrscheinlich das Ausbleiben der Vakuolenbildung nach Bestrahlung mit mehr als 3000 r.

Aus den Lebendbeobachtungen geht im übrigen hervor, daß die Zellen ein erstaunliches Regenerationsvermögen besitzen, und daß das Hyaloplasma bei der Beseitigung der Strahlenschäden eine besondere Rolle spielt.

Literatur

- BERNHARD, W., A. BAUER, I. HAREL et CH. OBERLING: Les formes intracytoplasmiques du virus fibromateux de Shope. Études de coupes ultrafines au microscope électronique. Bull. Cancer (Paris) **41**, 423—444 (1954).
- HARMS, A.: Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie. Kamp Lintfort: Staufen-Verlag 1959.
- HEILBRUNN, L. V.: The colloid chemistry of protoplasm. Protoplasma-Monographien, Bd. I. Berlin: Gebrüder Bornträger 1928.
- Grundzüge der allgemeinen Physiologie. Berlin: VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften 1959.
- HIRSCH, G. CH., u. L. H. BRETSCHNEIDER: Ascaris. II. Adsorption von Fe durch Golgi-Körper. Protoplasma (Wien) **29**, 9—30 (1937).
- LASFARGUES, E., and I. DI FINE: Specific vital staining of the Golgi-zone in tissue culture with Azur B. Anat. Rec. **106**, 29—35 (1950).
- LIPP, W.: Histochemische Methoden. 18. Lieferung. München: Oldenbourg 1958.
- SCHULZ, H., u. D. DE PAOLA: Delta-Cytomembranen und lamelläre Cytosomen. Z. Zellforsch. **49**, 125—141 (1958).
- TANAKA, H.: Golgi apparatus vitally stained with nile blue sulphate. Arch. exp. Zellforsch. **13**, 47—52 (1933).
- TARAO, S.: Microchemical studies on the Golgi apparatus using protease-nile blue sulphate technique. Cytologia (Tokyo) **2**, 261—281 (1940).
- VOLLMAR, H.: Wirkung von Röntgenstrahlen auf normale und auf Tumorzellen. Arch. exp. Zellforsch. **22**, 407—408 (1939).
- WEISSENFELS, N.: Lichtmikroskopische, kontinuierliche Kontrolle von Präparaten während der Fixierung, Kontrastierung, Entwässerung und Einbettung bei Gewebekulturen. IV. Internat. Kongr. für Elektronenmikroskopie, S. 60—63. Berlin: Springer 1958.
- Das Zentroplasma und die Golgi-Körper der Hühnerherzmyoblasten. Habil.-Schr. Bonn 1959.
- WILLIAMS, M.: Some observations on the action of radium on certain plant cells. Ann. Botany **39**, 547—553 (1925).
- WOHLFAHRT-BOTTERMANN, K. E., u. L. SCHNEIDER: Feinstrukturveränderungen bei der Sol-Gel-Transformation des Cytoplasmas. Naturwissenschaften **45**, 140 (1958).

Dr. ERNST WENDT,
Zoologisches Institut der Universität Bonn, Poppelsdorfer Schloß

Department of Anatomy, University of Maryland, School of Medicine
Baltimore 1, Maryland, U.S.A.

DEMONSTRATION OF AN ALCOHOL-CHLOROFORM INSOLUBLE,
PERIODIC ACID-SCHIFF
REACTIVE SUBSTANCE IN THE HYPOTHALAMUS OF THE RAT*

By

THEODORE F. LEVEQUE and GERALD A. HOFKIN**

With 6 Figures in the Text

(Received September 29, 1960)

Introduction

The morphologic and pharmacologic relationships between the supraoptic-paraventricular nuclear complexes of the hypothalamus and the neurohypophysis have been well documented (for review see SCHARRER and SCHARRER 1954, BARGMANN 1954). Although recent investigations indicate that the hypothalamus also exercises some measure of control over the functions which we attribute to the adenohypophysis (BENOIT and ASSENMACHER 1951, BOGDANOVE 1957, EVERETT 1956, HARRIS 1955, HUME 1958), the exact site and manner in which this is control is exercised is not completely understood.

In the course of working on this problem it was noted that when the hypothalamus and hypophysis were fixed in chilled absolute alcohol-chloroform, the neurosecretory material stainable with chrome-alum hematoxylin could no longer be demonstrated. When the periodic acid-Schiff (PAS) technique was applied to these alcohol-chloroform fixed tissues, a positive reaction was elicited in certain locations in the ventral portion of the anterior and middle hypothalamus but not in the pituitary. This material which stained with PAS was so located as to suggest a possible relationship to a factor or factors which might influence the adenohypophysis.

Since no mention of an alcohol-chloroform insoluble, PAS reactive substance in the anterior and middle hypothalamus could be found in the literature, this paper will discuss the topography and morphology of this substance, as well as the methods used to visualize it. The results of the effects of experimental procedures on this material will appear in a separate publication.

Materials and Methods

Forty-eight male white rats of the Holzman strain were studied. The animals ranged in weight from 100—410 grams when sacrificed. In an attempt to achieve optimum conditions of nutrition and minimum stress, the rats were kept on laboratory chow and tap water ad lib. in a temperature controlled room at least two weeks prior to the onset of the experiments.

Each rat was sacrificed by exposure to chloroform¹. The brain and the hypophysis were removed and placed either in chilled 2:1 absolute ethyl alcohol-chloroform, or Zenker-formol.

* This project supported by Research Grant B-1013 from National Institutes of Health.

** Macy Foundation Summer Research Fellow.

¹ Previous studies have shown that sacrificing the animals with chloroform has little or no effect on the presence of stainable neurosecretory material.

The tissues from thirty of the animals were fixed in absolute ethyl alcohol-chloroform. These tissues were allowed to remain in the fixative at 6° C for twenty-four hours. The trimmed hypothalamus and the hypophysis were then dehydrated in two changes of absolute ethyl alcohol for one hour each; two changes of methyl benzoate for forty-five minutes each; and two changes of benzene for forty-five minutes each. The tissues were then placed in three changes of filtered paraffin at 58° C and embedded in the usual manner. Serial sections were cut in the coronal plane at 7 or 10 μ for the hypothalamus, and at 7 μ for the hypophysis. The PAS procedure (LILLIE 1954) was applied to the sections from twenty of these animals. Tissues from the remaining ten animals were stained by the Gomori chrome-alum hematoxylin phloxin method (CAHP) (BARGMANN 1949).

Tissues from twelve other animals were fixed in Zenker-formol. These tissues were allowed to remain in the fixative at 25° C for twenty-four hours. They were then washed in running tap water for twenty-four hours, followed by twenty-four hours in 70% ethyl alcohol and LUGOL's solution in the dark. The trimmed brain and hypophysis were dehydrated in 80% ethyl alcohol for twenty-four hours, followed by one hour in 95% ethyl alcohol and one hour in absolute ethyl alcohol. The remainder of the dehydrating, embedding, and sectioning procedure was the same as for the absolute alcohol-chloroform fixed tissues. The PAS procedure was applied to six of these animals. The tissues from the other six animals were stained with CAHP.

The hypothalami from six animals were prepared according to RAMON-MOLINER's tungstate modification of the Golgi-Cox method (RAMON-MOLINER 1958).

Observations

Two different patterns of staining were observed depending on whether the tissues were fixed in Zenker-formol or in chilled alcohol-chloroform. In the Zenker-formol fixed tissues six sites had an affinity for PAS; whereas, in the absolute alcohol-chloroform fixed tissues, only two of the sites gave the PAS positive staining reaction. These patterns are diagrammatically represented in Fig. 1.

When the CAHP stain was applied to Zenker-formol fixed tissues, the characteristic blue neurosecretory material was demonstrated in the supraoptic and paraventricular nuclei, in the median eminence, in the infundibulum, and in the pars nervosa of the pituitary. However, when tissues fixed in alcohol-chloroform were stained with CAHP, no neurosecretory material could be seen.

The two sites which reacted with PAS following alcohol-chloroform fixation of the tissues were: 1. the ependyma around the rostral portion of the third ventricle at the level of the optic chiasm (the supraoptic recess) and 2. the ependyma composing the floor and part of the wall of the third ventricle in the region of the median eminence (the infundibular recess). In the region of the supraoptic recess, the reactive material is located within the cytoplasm of the ependymal cells and possibly between these cells. This substance also extends laterally away from the ventricle. PAS stainable substances could also be seen around the blood vessels in the region of the supraoptic recess, Fig. 2 and 4. The material in this rostral location was present as far caudal as the level of the anterior commissure (see Fig. 1). Between this location and the infundibular recess, no PAS stainable material was found in the alcohol-chloroform fixed tissues. In the region of the infundibular recess, the material in the alcohol-chloroform fixed tissues was found to accumulate around the periventricular blood vessels. There was a minimal amount of alcohol-chloroform insoluble material in the vicinity of the hypophyseal portal vessels. Except for a somewhat more pronounced

granular appearance, the material in this region had the same relationship to the ependyma in the floor of the ventricle as did the material in the supraoptic recess, Fig. 3 and 5. The material in this area of the infundibular recess did not extend for more than about 100 μ caudal to the level of the median eminence.

In Zenker-formol fixed tissues, four of the six sites which reacted with PAS were also stainable with CAHP. The disposition and appearance of the reactive material in these sites were essentially similar in both PAS and the CAHP stained material. These characteristics have been well described elsewhere (SCHARRER and SCHARRER 1954). The other two sites which had an affinity only for PAS

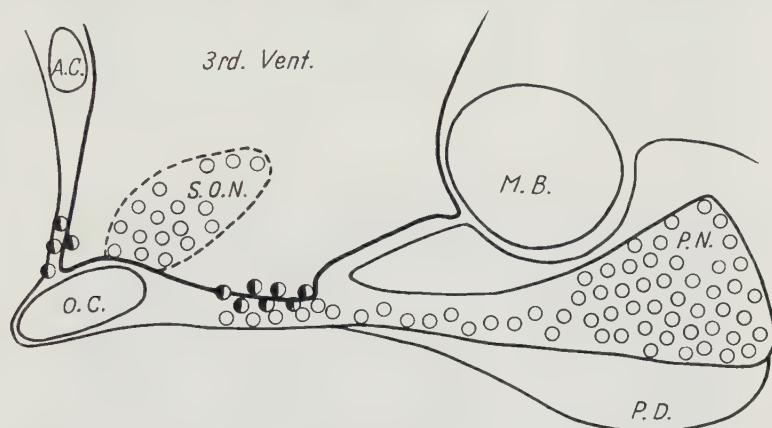


Fig. 1. Diagrammatic sagittal section of the hypothalamus of the rat showing locations of the PAS reactive material. The open circles indicate the sites of PAS reaction and CAHP reaction in the Zenker-formol fixed tissues. The half-shaded and half-open circles indicate a positive PAS reaction in both the chilled alcohol-chloroform and Zenker-formol fixed tissues. Circles appearing within the heavy lined area labelled "3rd Vent" represent reactions found within ependyma of the floor and part of the sides of the third ventricle. AC anterior commissure; OC optic chiasm; SON supraoptic nucleus; MB mammillary body; PN pars nervosa of pituitary; PD pars distalis of pituitary

correspond to the two sites found in the alcohol-chloroform fixed tissues, namely the ependyma of the floor of the supraoptic and infundibular recesses. Except for a sharper outline of the background because of the better fixation afforded by Zenker-formol, the appearance and disposition of the PAS positive material in these latter two sites is equivalent to that seen in the alcohol-chloroform fixed tissues. Comparison of Fig. 3, which is of Zenker-formol fixed PAS stained tissue, with Fig. 5, which is of a similar area in the alcohol-chloroform fixed PAS stained tissue, illustrates this observation.

The ependyma composing the floor of the supraoptic recess and the infundibular recess differs from that lining most of the sides. The sides of the ventricle are lined practically throughout their extent with a simple cuboidal epithelium. On the other hand, the floor and part of the sides of the recesses are composed of a stratified type of ependyma. Further, some of the ependymal cells lining the inferior part of the ventricle resemble embryonic cells in that they have a single fibrillar process that is directed laterally from the ventricle, curves ventrally, and extends into the median eminence. Similar cells have been described elsewhere by CAJAL (1952). The PAS positive material in the areas of the supraoptic and infundibular recesses appears interspersed between these cells or within



Fig. 2



Fig. 3

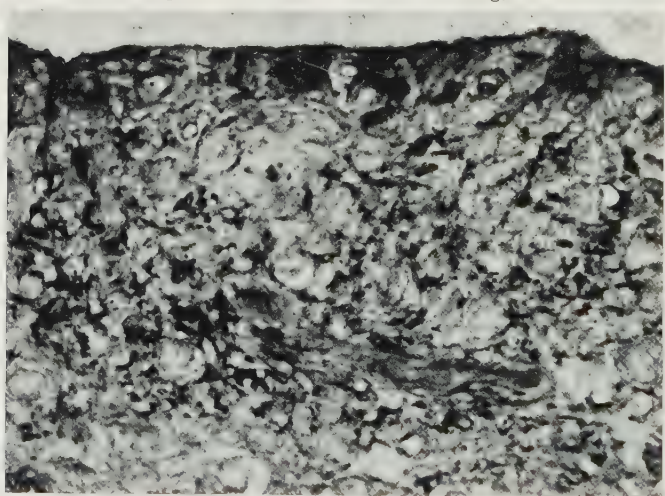


Fig. 4



Fig. 5

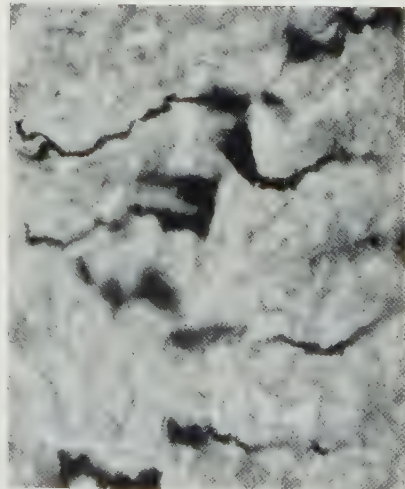


Fig. 6

their cytoplasm and fibrillar processes (see Fig. 2—5). Fig. 6 shows the processes of these ependymal cells quite clearly. In these two areas of activity, the bulbous nature of the ventral portion of the ventricle is more pronounced and the number of layers of ependymal cells is greater than elsewhere.

Discussion

WISLOCKI and LEDUC (1954) reported a periodic acid-Schiff substance associated with the glial cells of the periventricular portion of the caudal part of the third ventricle. They attributed this staining reaction to the presence of phagocytosed protein material in the cells. That the alcohol-chloroform insoluble, PAS positive material seen in the floor of the supraoptic and infundibular recesses is not phagocytosed material but that it may indeed represent an actual substance elaborated in these regions is supported by several observations. First, the material appears in the tissues of 100% of the animals and is always found in the two specific locations as described. Second, the material is always associated with an ependyma which is different from the simple cuboidal epithelium lining the ventricle elsewhere. Third, although the ependyma which lines the entire base of the supraoptic and infundibular recesses is stratified and fibrillar, the material is not associated with all of this characteristic ependyma but is found in very circumscribed areas within the recesses. These facts further suggest that the reactive material is not the result of a non-specific ependymal reaction. If it were, it would seem likely that the substance would be found elsewhere along the floor of the recesses and not with the marked regularity of morphology and location that was observed.

The increased depth of the stratification and the more numerous fibrillar cells of the ependyma in the areas of reactivity may prove to be quite significant in elucidating the exact nature of the cells that produce this material. However, just how these specific cells differ from the rest of the stratified and fibrillar ependyma cannot be elaborated upon until a more thorough study is completed.

The results also quite definitely indicate that the alcohol-chloroform insoluble, PAS positive substance is not the Gomori stainable neurosecretory material of the supraoptic paraventricular hypophyseal complex. When the CAHP method of GOMORI was applied to alcohol-chloroform fixed tissues, the characteristic reaction of the neurosecretory material could not be elicited. Further, the four areas which in Zenker-formol fixed tissues exhibit an affinity for CAHP showed no PAS reactivity in the alcohol-chloroform fixed tissues even though the CAHP stainable neurosecretory material is known to give a positive reaction with PAS. These four areas are the supraoptic and paraventricular nuclei, the median eminence, the infundibulum, and the pars nervosa of the pituitary. Furthermore, SCHIEBLER

Fig. 2. Region of the supraoptic recess of the third ventricle. Alcoholchloroform fixed, PAS stained, $\times 100$

Fig. 3. Third ventricle in region close to infundibular recess. Zenker-formol fixed, PAS stained, $\times 100$

Fig. 4. Enlargement of part of left ventricular wall shown in Fig. 2, $\times 400$

Fig. 5. Same area as Fig. 3. Alcohol-chloroform fixed, PAS stained, $\times 100$

Fig. 6. Ependymal cells found in the lowermost sides of the third ventricle. MOLINER's modification of the Golgi-Cox technique, $\times 1000$

(1951) and others (HILD and ZETLER 1949) have shown that the CAHP stainable neurosecretory material is soluble in alcohol-chloroform; SCHIEBLER states "...the selective staining of the neurosecretory hypothalamic-neurohypophyseal system is dependent on the avoidance of fixatives containing alcohol...". It is therefore concluded that the alcohol-chloroform insoluble, PAS positive material is separate and distinct from the alcohol-soluble, PAS positive, CAHP stainable neurosecretory material.

Thus, it would appear that the six sites of PAS reactivity in the Zenker-formol fixed tissues represent at least two different substances. The four sites corresponding to the four areas which stain with CAHP in Zenker-formol fixed tissues represent the areas of stainable neurosecretory material. The two sites corresponding to the two sites of PAS reactivity in the alcohol-chloroform fixed tissues represent the alcohol-insoluble substance. That both give positive PAS reactions may indicate that each of these substances is bound to a carrier, probably a carbohydrate protein complex (LEBLOND et al. 1957), containing free 1,2-glycol groups.

The work of many investigators confirm the opinion that the four areas which stain both with CAHP and PAS represent the same substance, namely, the classic neurosecretory material (SCHARRER and SCHARRER 1954). But, because the alcohol-chloroform insoluble substance is located at two separate sites, it is possible that we are dealing with more than one specific substance, each of which is bound to a PAS positive carrier substance and composed of a compound insoluble in alcohol-chloroform. That this situation may exist is given support by the recent experiments of HUME (1958), GREER (1957), and others. These workers have shown that there seems to be several specific areas in the hypothalamus which affect release of hormones from the adenohypophysis. Hume defines such an area in the anterior median eminence which influences adrenocortical hormone release, and an area in the posterior limb of the stalk which controls gonadotropic hormone release. Greer, on the other hand, defines an area close to and overlapping somewhat HUME's ACTH area which influences thyrotropic hormone release. Moreover, the preliminary results of experiments in our laboratory indicate that the alcohol-chloroform insoluble substance becomes mobilized in different manners in the two sites depending on the nature of the stimulus applied to the animals. Extensive studies are now in progress which we hope will give more definite information as to the nature and function of this substance.

Summary

An alcohol-chloroform insoluble, periodic acid-Schiff reactive substance associated with the ependymal lining of the supraoptic and infundibular recesses was demonstrated in the hypothalamus of the white rat. Although the ependyma is stratified and contains cells with long processes throughout the extent of the recesses, the PAS reactive substance is present in very circumscribed areas within the recesses. It was also shown that this PAS reactive substance is not related to neurosecretory material which has an affinity for chrome-alum hematoxylin and aldehyde fuchsin. The regularity of appearance and location of the substance may be taken as evidence in favor of its being a specific material elaborated in the regions mentioned.

The possibility of the reactive material in each site representing different compounds, each of which is associated with a substance possessing 1,2-glycol groups, is discussed.

Literature

- BARGMANN, W.: Über die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse. *Z. Zellforsch.* **34**, 610—634 (1949).
- , Das Zwischenhirn-Hypophysensystem. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.
- BENOIT, J., et I. ASSENMACHER: Dispositifs nerveux de l'éminence médienne: leur rapports avec la vascularisation hypophysaire chez le canard domestique. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **145**, 1395—1398 (1951).
- BOGDANOV, E. M.: Selectivity of the effects of hypothalamic lesions and pituitary trophic hormone secretions in the rat. *Endocrinology* **60**, 689—697 (1957).
- CAJAL, S. R.: *Histologie du Système Nerveux de l'homme et des vertébrés*. Inst. Ramon y Cajal, Madrid, 1952.
- EVERETT, J. W.: Functional corpora lutea maintained for months by autografts of rat hypophysis. *Endocrinology* **58**, 786—796 (1956).
- GREER, M. A.: Studies on the influence of the central nervous system on anterior pituitary function. *Recent Prog. Hormone Res.* **13**, 67—104 (1957).
- HARRIS, G. W.: *Neural Control of the pituitary gland*. London: Edward Arnold 1955.
- HILD, W., and G. ZETLER: Über die Funktion des Neurosekrets im Zwischenhirn-Hypophysensystem als Trägersubstanz für Vasopressin, Adiuretin und Oxytocin. *Z. ges. exp. Med.* **120**, 236—243 (1956).
- HUME, D. W.: Hypothalamic localization for the control of various endocrine secretions. In JASPER, PROCTER, et al., *Reticular formation of the brain*, chap. 11, p. 231—262. Boston: Little, Brown & Company 1958.
- LEBLOND, C. P., R. E. GLEGG and D. EIDINGER: Presence of carbohydrates with free 1,2-glycol groups in sites stained by periodic acid-Schiff technique. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 445—459 (1957).
- LILLIE, R. D.: *Histopathologic technic and practical histochemistry*. New York: Blakiston Company 1954.
- RAMON-MOLINER, E.: A tungstate modification of the Golgi-Cox method. *Stain Technol.* **33**, 19—29 (1958).
- SCHARRER, E., and B. SCHARRER: Neurosekretion. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, herausgeg. von W. BARGMANN. Bd. 6, Teil 5, S. 953—1066. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954.
- SCHIEBLER, T. H.: Zur Histochemie des neurosekretorischen hypothalamisch-neurohypophysären Systems. *Acta anat. (Basel)* **13**, 233—255 (1951).
- WISLOCKI, G. B., and E. H. LEDUC: The cytology of the subcommissural organ, Reissners fiber, periventricular glial cells and posterior collicular recess of the rat's brain. *J. comp. Neurol.* **101**, 283—299 (1954).

Prof. Dr. THEODORE F. LEVEQUE, Department of Anatomy, University of Maryland, Medical School, 29 South Greene Street, Baltimore 1, Maryland, U.S.A.

Aus der Abteilung für Medizinische Elektronenmikroskopie an der Universität Münster
(Leiter: Prof. Dr. PFEFFERKORN)
und der Poliklinik und Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten Münster
(Direktor: Prof. Dr. WANNENMACHER)

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AM GESUNDEN UND KARIÖSEN DENTIN MIT HILFE DER ABDRUCKMETHODE UND DER SCHNITTMETHODE AN KOMPAKTER, NICHTENTMINERALISIERTER SUBSTANZ

Von

HANS-JÜRGEN HÖHLING

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. September 1960)

Die bisherigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen am Dentin wurden fast ausschließlich mit Hilfe der Ultradünnschnitt-Technik an entmineralisierter Substanz (FRANK 1954, 1956, 1957a; KENNEDY 1953; SCOTT 1953, 1955 und TAKUMA 1956) und der indirekten Abdruckmethode (FRANK 1954, HELMCKE 1955, KATO 1956, LENZ 1955, MENKE 1950, PETER 1959, PLAČKOVÁ 1959, ROUILLE 1952, SCOTT 1953, TAKUMA 1956, YASUZUMI 1955) durchgeführt. Während diese Untersuchungen zu Aussagen über die organische Grundsubstanz im Bereich der Dentinmatrix, der Hofbezirke um die Dentinkanälehen und der Dentinkanälehen selber führten, gaben sie noch keine Aufklärung über das gesamte anorganische und organische Gefüge des Dentins, da die Strukturelemente wesentlich kleiner sind als im Schmelz.

Um zur Klärung der Größe und Anordnung dieser Elemente beizutragen, wurde die Schnitt-Technik an nicht entmineralisierter Substanz durchgeführt, eine Methode, die schon mit Erfolg auf den Schmelz (HÖHLING 1960a, 1960c) und von anderer Seite auch auf das Dentin (FRANK 1959, MILLARD 1960) angewandt wurde. Sie wurde mit der Abdrucktechnik kombiniert.

Präparation

1. Abdruckmethode. Bei den Abdruckuntersuchungen wurde meist die Triafolmethode angewandt, in einigen Fällen auch das vor kurzem eingeführte Tyloseverfahren (POHLMANN 1959). Zuvor wurden die Anschliff-Flächen mit Diaplast, einer hochviskosen Diamantkornmasse (Fa. Ernst Winter und Co., Hamburg) in den Körnungsstufen von 7—0,25 μ , auf Glanz poliert. Diese polierten Flächen gelangten direkt zum Abdruck oder nach Anätzung mit $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{2}$ - oder 1-normaler HCl. Die Schrägbeschattung im Hochvakuum erfolgte mit SiO₂, die Bedampfung mit Kohle. Nach dem Ablösen des Triafols bzw. der Tylose wurde die Kohle-SiO₂-Matrize im Elektronenmikroskop untersucht.

2. Schnittmethode. Dünne Dentinscheibchen bzw. zerbrochene Partien wurden nach der Extraktion in 1%iger Osmiumsäure bzw. in konzentriertem Alkohol fixiert. Die Dauer der Fixation wurde an einzelnen Proben zwischen 4 Std und 2 Tagen variiert. Eine Nachkontrastierung erfolgte mit Uranylacetat und Phosphorwolframsäure. Die Präparate wurden in Methacrylat mit dem Mischungsverhältnis 6:4 von Butyl- zu Methyl-Ester eingebettet, um für die Substanz ein entsprechend hartes Einbettungsmittel zu erhalten. Danach konnte das zu einer feinen Spitze zugefeilte Präparat am Porter-Blum-Mikrotom mit einem Diamantmesser — Schneidenwinkel 60° — geschnitten werden.

Ergebnisse

1. Schmelz-Dentin-Grenze. Bei den Abdruck- und Schnitt-Untersuchungen konnte die Schmelz-Dentin-Grenze beobachtet werden. Wie Abb. 1 zeigt, verläuft die Grenze zwischen Schmelz und Dentin entlang einer ungeraden Linie. Zur Schmelzseite hin erkennt man die „Schmelzprismen“. Beim Übertritt von der Grenzlinie in den Dentinbereich setzen allmählich die Dentinkanälchen mit zunehmender Zahl ein. Auf der Abb. 1 ist erst ein Kanälchen sichtbar. Wie schon von anderer Seite festgestellt wurde, erscheint die Dentingrunds substanz als ziemlich homogene, körnige Masse. Das Schnittbild (Abb. 2) zeigt gegenüber dem Abdruck deutlich den strukturellen Unterschied beider Bereiche. Trotz Stauchung im härteren Schmelz sieht man eine gerichtete Orientierung der Apatiteinkristalle, während man im Abdruck nur die „Schmelzprismen“ erkennen kann (Einzelheiten über den Schmelz bei HÖHLING 1960a, c). Im Dentinbereich liegen kleinere, bei dieser Vergrößerung noch nicht näher bestimmbare Bauelemente vor, die netzartig angeordnet sind. Weiterhin zeigt das Schnittbild, daß die Grenzlinie zwischen Schmelz und Dentin nicht eine Scheide anderer Zusammensetzung darstellt, sondern daß sich die beiden Hartsubstanzen entlang dieser Grenze *direkt* berühren.

2. Hofbezirk um die Dentinkanälchen (translucent area) im Querschliff und Querschnitt. Abb. 3 zeigt ein typisches Abdruckbild einer auf Glanz polierten Anschliff-Fläche. Die Dentinkanälchen umgibt ein Hofbezirk, der eine glattere Struktur aufweist als die übrige Dentingrunds substanz. Derartige Bilder wurden schon von FRANK (1954), PLAČKOVÁ (1959) und TAKUMA (1956) gefunden. Auch nach meiner Auffassung liegt eine dichtere, härtere Substanz vor, die aus noch kleineren Bauelementen besteht als die übrige Dentingrunds substanz. Mehr als diesen indirekten Schluß kann man aus den Abdruckbildern nicht ziehen. Auch auf den Abdrücken *angeätzter* Schliff-Flächen ließen sich keine weiteren Strukturelemente erkennen (Abb. 4). Während die Grunds substanz meist noch körniger hervortrat, konnten im Bereich der Dentinkanälchen runde Aufwölbungen beobachtet werden. Der Hofbezirk war nicht mehr zu erkennen. Er wird wegen des höheren Anteils an anorganischer Substanz offenbar stärker angeätzt als die Dentingrunds substanz, so daß eine muldenförmige Vertiefung entsteht, die die Dentinkanälchen mit einschließt; aus dieser Vertiefung ragen vermutlich nur die Odontoblastenfortsätze heraus. An den Aufwölbungen, die sich im Abdruck aus den Vertiefungen ergeben, haften oft fibrilläre (Abb. 4) oder tubuläre Gebilde, die schon von anderer Seite beobachtet (KATO 1956, MENKE 1950, PLAČKOVÁ 1959, SCOTT 1950 und 1953, TAKUMA 1956, YASUZUMI 1955) und allgemein als die Odontoblastenfortsätze oder als Scheide an der Innenwand der Dentinkanälchen bezeichnet wurden. Die in den eigenen Untersuchungen gefundenen fibrillären bzw. tubulären Gebilde werden nicht als Bestandteile der organischen Substanz im Innern der Dentinkanälchen gedeutet, sondern als Ergebnisse der Präparation. Die Abdruckfolie dringt in den Hofbezirk und in die Kanälchen ein. Beim Abheben von der Dentinoberfläche wird die schlauchförmige Vertiefung der Folie in seltenen Fällen unbeschädigt herausgerissen, so daß ein geschlossenes tubuläres Gebilde auf dem Abdruckbild zu sehen ist; meist wurde die schlauchartige Vertiefung der Folie beim Herausreißen aufgerissen, so daß fetzenartige und fädige Gebilde zu sehen waren, wie in Abb. 4. Solche Gebilde wurden auch bei Schmelzabdrücken im Bereich der „Schmelzprismen“-Grenze

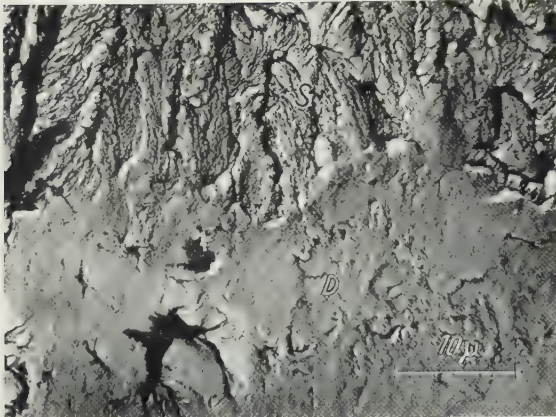


Abb. 1. Triafolabdruck. Schmelz-Dentin-Grenze. Vergr. 1560:1.
S Schmelzbereich; D Dentinbereich

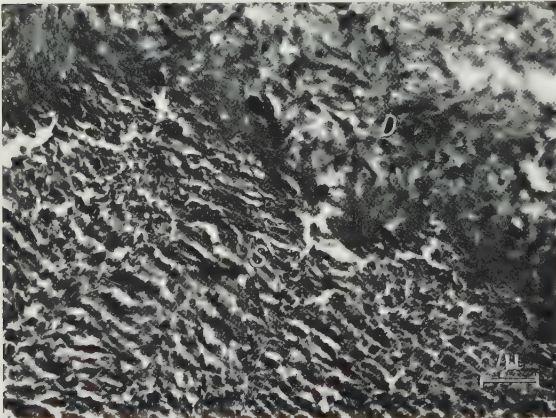


Abb. 2. Schnitt durch kompakte, nicht entmineralisierte Substanz. Schmelz-Dentin-Grenze. Vergr. 6950:1.
S Schmelzbereich; D Dentinbereich

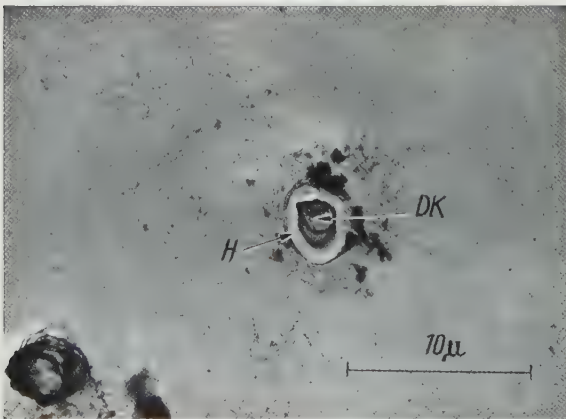


Abb. 3. Tyloseabdruck von polierter Dentin-Anschliff-Fläche. Ein glatter Hofbezirk (translucent area) um das Dentinkanälchen. Vergr. 2340:1. DK Dentinkanälchen; H Hofbezirk um die Kanälchen

gefunden (HÖHLING 1960 c); sie lassen sich auf Grund häufiger Beobachtung von organischen Fasergebildnen unterscheiden. Die Entstehung dieser fibrillär-fetzenartigen Strukturen wird auch von PLAČKOVÁ (1959) auf die Präparation zurückgeführt. Es bleibt die Frage, ob diese „Artefaktbildung“ auch bei den beobachteten fibrillären bzw. tubulären Gebilden der anderen genannten Autoren eine wesentlich Rolle spielt. Es müßte eine Methode ausgearbeitet werden, nach der man echte Fasern von solchen „Artefaktbildungen“ trennen kann.

Da die Abdruckmethode zur Aufklärung der Art, Größe und Anordnung der Grundelemente im Hofbezirk wie im Bereich der Dentinmatrix nicht befriedigen konnte, wurde die beschriebene Schnittmethode angewandt. Der Hofbezirk tritt auch im Schnittbild deutlich hervor (Abb. 5). Darüber hinaus zeigt schon dieses Bild mittlerer Vergrößerung, daß im Schnitt mehr Strukturfeinheiten erkennbar sind. Der Hofbezirk ist auch im Schnittbild glatter als die Dentinmatrix. Infolge Stauung ist er oft schollenartig zerbrochen wie der Schmelz, eine Erscheinung, die außerdem auf das Vorhandensein harter Substanz schließen läßt. Der morphologische Unterschied, die glatte Struktur des Hofbezirks gegenüber der Grundsubstanz, tritt im Kohlenhüllenbild

der Ultradünnschnitte noch deutlicher hervor. Das Schnittbild zeigt weiter, daß die umstrittene Scheide zwischen Hof und Matrix nicht existiert. Vielmehr berühren sich beide Bereiche direkt entlang einer ungleichmäßig runden Trennlinie um die Kanälchen. Im Querschnittbild erscheint der Hofbezirk auch bei stärkerer Vergrößerung ziemlich homogen. Es ließen sich hier und da winzige runde Gebilde beobachten, die die quergetroffenen Elementarfibrillen der Kollagenfasern sein dürften, da derartige „Tüpfel“ auch im Querschnitt der Kollagenfaserstränge der Dentinegrundsubstanz beobachtet wurden. Da in diesem Bereich keine Kristallite zu sehen waren, liegt offenbar eine sehr feinkörnige, kolloidale anorganische Apatitsubstanz in Kontakt mit fibrillären Gebilden vor. Da die Strukturelemente stark maskiert sind, wären Versuche partieller Auflösung an den Ultradünnschnitten erforderlich, um das anorganische und organische Gefüge getrennt beobachten zu können.

3. Dentinegrundsubstanz (Dentinmatrix). Wie Abb. 2 und 5 zeigten, besitzt die Grundsubstanz ein netzartiges Gefüge ohne gerichtete Orientierung der Bauelemente. An dünnen Schnitten erkennt man bei mittle-

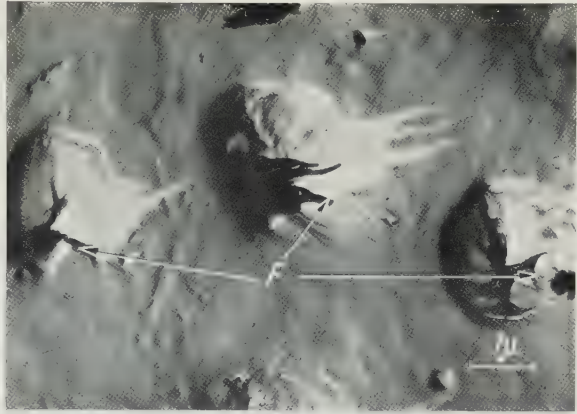


Abb. 4. Triaxialabdruck von polierter, angeätzter Dentin-Anschliff-Fläche ($\frac{1}{10}$ n HCl; ~ 15 sec). Aufwölbungen im Bereich der Dentinkanälchen mit fibrillär-fetzenartigen Gebilden. Vergr. 7700:1. *F* fibrillär-fetzenartige Gebilde

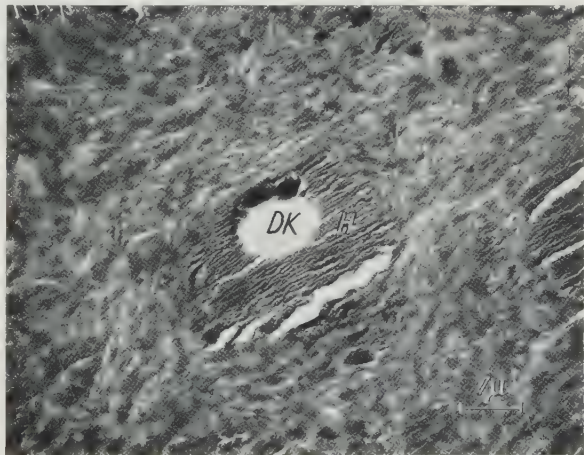


Abb. 5. Schnitt durch kompakte, nicht entmineralisierte Substanz: Dentinkanälchen quergetroffen. Glatter, durch den Schnittvorgang gestauchter Hofbezirk, von netzstrukturierter Grundsubstanz umgeben. Vergr. 8000:1. *DK* Dentinkanälchen; *H* Hofbezirk um die Kanälchen

rer Vergrößerung ($\sim 8000:1$) oft fibrilläre Gebilde mit der für Kollagen charakteristischen Querstreifung. Sie liegen einzeln oder auch im Verband vor. Sie wurden von anderer Seite schon auf Abdruckbildern (MENKE 1950, PETER 1959, PLAČKOVÁ 1959, ROUILLER 1952, SCOTT 1953) und auf Schnitten entmineralisierter Substanz (FRANK 1957a, SCOTT 1953) beobachtet. Vielfach zeigte sich bei stärkerer Vergrößerung der eigenen Schnittbilder eine „Ausfaserung“ in winzige, stäbchenförmige Grundelemente mit einem Querdurchmesser im Bereich von 6–12 $m\mu$. Man könnte zunächst versucht sein, sie als kristalline Gebilde

anzusprechen. Da aber die Ausfaserung von kompakteren Fasern beobachtet wurde, da die Gebilde ferner oft gekrümmt und ungleich dick sind, ferner keine ebenen Umgrenzungsflächen besitzen, kann es sich nicht um Kristallite handeln. Dagegen wurden auf dünnen Schnitten oft „hellere“ Bauelemente beobachtet, an denen in einigen Fällen prismatische Flächen zu erkennen waren. Diese Feststellung, wie die Dunkelfeldbeobachtungen bei Bragg-Reflexen, weisen darauf hin, daß es sich hier um die Hydroxylapatitkristallite des Dentins handelt. Mit einem Durchmesser zwischen 15 und 30 $m\mu$, bei einem Häufigkeitsmaximum um 18 $m\mu$, sind sie wesentlich kleiner als die Schmelzkristallite, für die ein mittlerer Durchmesser um 70 $m\mu$ ermittelt wurde (HÖHLING 1960a, c).

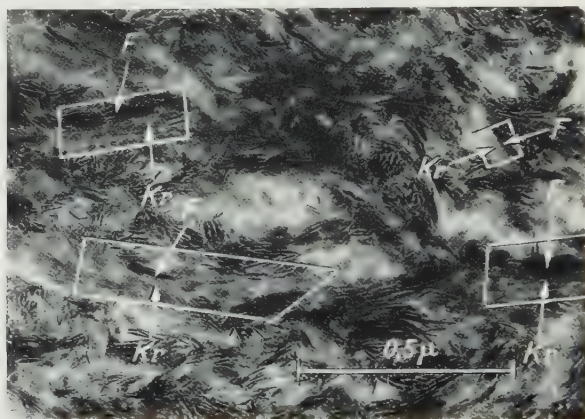


Abb. 6. Schnitt durch kompakte, nicht entmineralisierte Substanz. Parallelorientierung der Kristallite und Faserelemente in den markierten Bereichen. *Kr* Kristallite, *F* Fibrillenelemente. Vergr. 56 000:1

An einigen einzeln gelegenen, gut erhaltenen Kristalliten konnte eine Zuspitzung beobachtet werden, so daß die Dentinkristallite wie die Schmelzkristallite (HÖHLING 1960a, c) auch hexagonale Pyramiden besitzen dürften. Es bleibt auch hier, wie beim Schmelz, die Frage, ob neben den Pyramiden auch die Basisflächen als Wachstumsflächen ausgebildet sind.

Das wesentliche Ergebnis der Untersuchungen im Bereich der Dentinmatrix besteht darin, daß bei stärkerer Vergrößerung (direkte Beobachtung von $\sim 40\,000:1$) an sehr dünnen Schnitten oft eine Parallelorientierung der prismatischen Kristallite zu den Fasergrundelementen zu erkennen ist (HÖHLING 1960b) (Abb. 6). Diese Orientierung ist so auffallend, daß es sich offenbar um eine epitaktische Verknüpfung zwischen den Kristalliten und den Fasergrundelementen handelt, die schon von PERDOK (1955) auf Grund der Gitterstruktur des Hydroxylapatits und des molekularen Aufbaus der Kollagenfasern vorausberechnet wurde. Danach soll vor allem eine feste Bindung durch Wasserstoffbrückenbildung zwischen den OH-Gruppen des Hydroxylapatits und den Aminosäurerest-Gruppen der Kollagenfasern bestehen. Beide Gruppen folgen im Abstand von $\sim 3,4 \text{ \AA}$ in der Längsrichtung der Fasern und Kristallite aufeinander. In Abb. 6 ist diese Orientierung in den markierten Bereichen angezeigt. Infolge der leicht eintretenden Unschärfe bei stärkerer Vergrößerung, der relativen Dicke der Schnitte bei harten Substanzen und der sehr geringen Größe der Gebilde ist diese Orientierung

nicht ideal zu beobachten. Da sie aber oft gesehen wurde, ist eine solche epitaktische Verknüpfung, wie sie in Abb. 7 noch einmal schematisch angezeigt ist, sehr wahrscheinlich gemacht. Sie dürfte das wichtigste Bauprinzip im Dentin sein. Weitere Strukturelemente wurden bisher nicht gefunden.

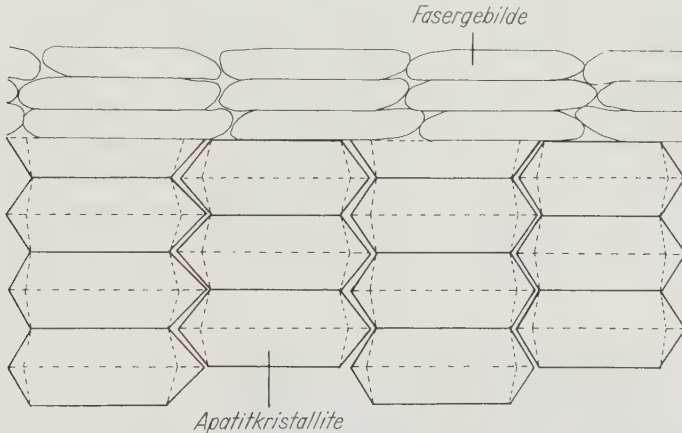


Abb. 7. Schema der epitaktischen Verknüpfung zwischen den Apatitkristalliten im Dentin und den Kollagenfibrillen

Dentinkaries

In unseren Untersuchungen am kariösen Dentin lassen sich wesentliche Abweichungen vom gesunden Dentin feststellen. In den Anfangsstadien der Karies beobachtet man oft eine körnige Struktur, die an die Stelle der netzartigen des gesunden Dentins tritt, d.h. die Fasern beginnen in kleinere Einheiten zu zerfallen. Im weiteren Verlauf der Karies wird die epitaktische Bindung unter allmählicher Auflösung der organischen Faserelemente und Kristallite gelöst, so daß eine wirre Anordnung entsteht (Abb. 8). Diese Vorgänge sind nach den bisherigen Schnittuntersuchungen kennzeichnend für die Karies. Bei stärkerer Vergrößerung solcher aufgelockerten Kariesschnitte lassen sich die dunklen, stäbchenförmigen Fibrillenelemente leicht von den helleren Kristalliten unterscheiden (HÖHLING 1960b). Es wurde oft geäußert, daß sich die Karies von den Dentinkanälchen aus verbreitet, wie es Abdrücke von Querschliffen oft vermuten lassen. Da aber bei beginnender und weiter fortgeschrittener Karies auf den Schnittbildern meist eine *gleichmäßige* Désorientierung über den gesamten Schnitt beobachtet wurde, kann ich mich einer solchen strengen Auffassung nicht anschließen. Erst im Falle der völligen Auflösung der Strukturelemente konnte eine hofartige Ausbreitung von den Dentinkanälchen aus, eine „Kariesfront“, beobachtet werden, wie sie Abb. 9 zeigt. Demnach kann *nach* der Zerstörung der dichten Hofbezirke eine gerichtete Auflösung von den Kanälchen ausgehen.

Weiterhin wurden unter anderem von HELMCKE (1955) und FRANK (1957b) rhomboedrisch aussehende Kristallite, sog. „Karieskristalle“, beobachtet, die noch größer sind als die Apatitkristallite im Schmelz (die größten Kristallite auf dem Bild besitzen einen Durchmesser um $200\text{ m}\mu$). HELMCKE vermutet, daß es sich um Kalzitkristallite (evtl. ein anderes Phosphat als Apatit) handelt. Wie

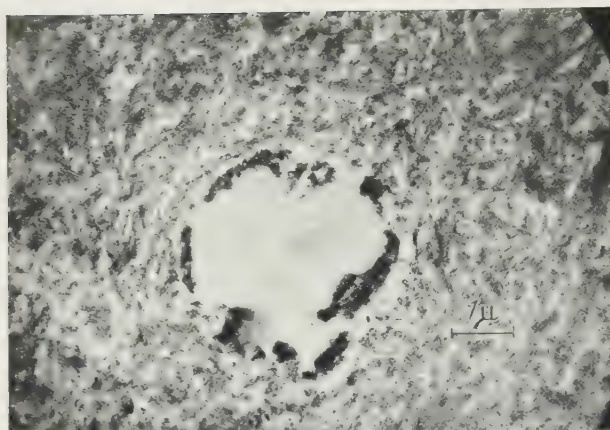


Abb. 8. Schnitt durch kariöses Dentin. Wirre Anordnung der Apatitkristallite und fibrillären Grundelemente. Vergr. 8000:1

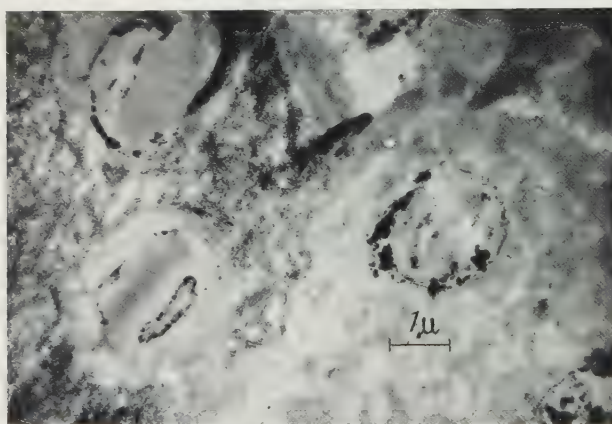


Abb. 9. Schnitt durch kariöses Dentin. Hofartige Ausbreitung im Falle der völligen Zersetzung. Vergr. 8000:1

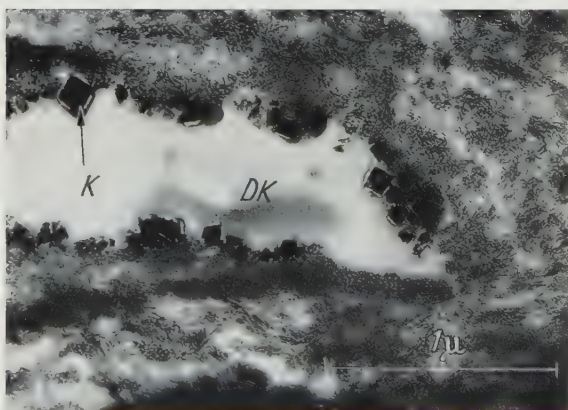


Abb. 10. Schnitt durch kariöses Dentin. Rhomboedrisch aussehende „Karieskristallite“ an der Innenwand der Dentinkanälchen. Vergr. 30 000:1. K Karieskristallite; DK Dentinkanälchen

Abb. 10 zeigt, wurden solche Kristallite auch von uns gefunden, jedoch nicht so häufig. Sie traten nur an der Innenwand der Dentinkanälchen auf. Da sie nicht regelmäßig beobachtet wurden, ist diese Kristallneubildung nicht kennzeichnend für die Karies schlechthin, sondern wohl nur typisch für ein bestimmtes Stadium der kariösen Zersetzung, in dem die Ca^{++} und HPO_4^{2-} -Ionenkonzentration einen für die Bildung günstigen pH-Wert hervorruft. Diese Ansicht wird bestärkt durch Kristallisationsversuche von HAYEK (1951), der in einem bestimmten Bereich der Ca^{++} - und HPO_4^{2-} -Ionenkonzentration im elektronenmikroskopischen Bild neben den hexagonalen Apatitkristalliten größere rhomboedrisch aussehende Kristallite fand. Sie sind den beobachteten „Karieskristalliten“ so ähnlich, daß es sich um dieselbe Verbindung handeln dürfte, für die nach HAYEK die Formel Ca HPO_4 zutrifft. Trotz der bemerkenswerten Ähnlichkeit sollen Feinbereichs-Beugungsuntersuchungen durchgeführt werden, sobald wieder derartige Kristallite im Schnitt beobachtet werden.

Zusammenfassung

Um zur Klärung der Frage nach der Struktur der Dentinegrundsubstanz und der Hofbezirke um die Dentinkanälchen beizutragen, wurden Abdrücke und Schnitte von nicht entmineralisierter Dentinsubstanz angefertigt. Auf Abdruckbildern polierter Anschliff-Flächen hebt sich der Hofbezirk durch eine glattere Oberfläche von der übrigen Dentinegrundsubstanz deutlich ab. Daraus kann man schließen, daß er aus noch kleineren Bauelementen als die Dentinmatrix besteht und ein dichtes, festes Gefüge bildet. Die Dentinmatrix erscheint im Abdruck körnig. Die Schnittbilder von nicht entmineralisiertem Dentin gestatten einen tieferen Einblick in die Struktur. Im Bereich der Dentinmatrix wurden Hydroxylapatitkristallite beobachtet (Querdurchmesser 15—30 $m\mu$), die oft Kollagenfasern in ihrer Längsrichtung parallel laufen. Die Kollagenfasern sind meist in kurze, fibrilläre Grundelemente mit einem Querdurchmesser im Bereich von 6—12 $m\mu$ ausgefasert. Die orientierte Zusammenlagerung der Kristallite und Fasergrundelemente läßt auf epitaktische Verknüpfung schließen, wie sie schon von PERDOK vorausberechnet wurde.

Schnittbilder von *kariösem Dentin* zeigen, daß sich die Karies im wesentlichen in einer Desorientierung der Kristallite und Fasern unter Auflösung der Bauelemente äußert. Ferner wurden zuweilen rhomboedrisch aussehende „Karieskristallite“ beobachtet, die den von HAYEK bei Kristallisationsversuchen gefundenen Phosphatkristallen der Formel $Ca HPO_4$ weitgehend ähneln. Offenbar wird dieses Phosphat bei der Karies gebildet.

Literatur

- FRANK, R. M.: Structure infra-microscopique du canalicule dentinaire au microscope électronique. *Actualités odontostomat.* **10**, 361—376 (1956).
- Contributions à l'étude au microscope électronique des tissus calcifiés normaux et pathologiques. Thèse, présentée pour le Doctorat en Médecine, Strassbourg 1957 a.
- Microscopie et diffraction électronique des éléments cristallins de la dent. *Odont. Revy* **8**, 288—296 (1957 b).
- Elektron microscopy of undecalcified sections of human adult dentin. *Arch. oral. Biol.* **1**, 29—32 (1959).
- , SHROFF, F. R., K. J. WILLIAMSON and W. S. BERTAUD: Electron microscope studies of dentinal canals. *Oral Surg.* **7**, 662—670 (1954).
- HAEYK, E., F. MÜLLNER u. K. KOLLER: Zur Kenntnis des Hydroxylapatits. *Mh. Chem.* **82**, 959—969 (1951).
- HELMCKE, J. G.: Elektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen an gesunden und kranken Zähnen. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **10**, 1461—1478 (1955).
- HÖHLING, H. J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Ultradünnschnitten von kompaktem, nicht vorbehandeltem Zahnschmelz. *Z. Naturforsch.* **15b**, 59—61 (1960 a).
- , u. RUTH ERWIG: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen am kompakten, nicht vorbehandelten Zahnschmelz. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **17** (1960 c, im Druck).
- Untersuchungen elektronenmikroskopischer Schnittbilder am gesunden und kranken Dentin. *Z. Naturforsch. b* (1960 b). Kurze Originalmitteilung (im Druck).
- KATO, S., T. SAKUMA and J. TAMURA: Electron-microscopic observation on dentinal tubules of human teeth. *Okajimas Folia anat. jap.* **28**, 237—241 (1956).
- KENNEDY, J. J., G. W. TEUSCHER and L. S. FOSDICK: The ultramicroscopic structure of enamel and dentin. *J. Amer. dent. Ass.* **46**, 423—431 (1953).
- LENZ, H.: Elektronenmikroskopischer Nachweis der Dentinveränderung durch Karies. *Dtsch. Zahn-, Mund- u. Kieferheilk.* **22**, 24—33 (1955).

- MENKE, E.: Elektronenmikroskopie an der menschlichen Zahnhartsubstanz. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **115**, 1—18 (1950).
- MILLARD, H., and F. G. E. PAUTARD: Electron microscope observations on apatite crystallites in human dentin and enamel. *Vierter Internat. Kongr. für Elektronenmikroskopie*. Berlin, 1958. *Verh.*, Bd. 2, S. 357. Berlin 1960.
- PERDOK, W. G.: Physikalisch-chemische Beziehungen zwischen anorganischer und organischer Schmelzsubstanz. *Schweiz. Mschr. Zahnheilk.* **65**, 637—646 (1955).
- PETER, J.: Elektronenmikroskopische Darstellung von Faserstrukturen im Dentin. *Schweiz. Mschr. Zahnheilk.* **69**, 680—689 (1959).
- PLAČKOVÁ, PŘIBYL, J., u. J. ŠTĚPÁNEK: Eine elektronenmikroskopische Studie der Dentinstruktur. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **14**, 1010—1013 (1959).
- POHLMANN, G., u. O. H. VOLK: Tylose, ein wasserlösliches Abdruckmittel für Oberflächenuntersuchungen. *Z. wiss. Mikr.* **64**, 252—256 (1959).
- ROUILLER, CH., L. HUBER et E. RUTISHAUSER: La structure de la dentine. *Acta anat. (Basel)* **16**, 16—28 (1952).
- SCOTT, D. B.: Recent contributions in dental histology by use of the electron microscope. *Int. dent. J.* **4**, 64—95 (1953).
- The electron microscopy of enamel and dentin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **60**, 575—584 (1955).
- , and R. W. G. WYCKOFF: Electron microscopy of human dentin. *J. dent. Res.* **29**, 556—560 (1950).
- TAKUMA, S., Y. KURAHASHI, N. YOSHIOKA and A. YAMAGUCHI: Some considerations of the microstructure of dental tissues revealed by the electron microscope. *Oral Surg.* **9**, 328—343 (1956).
- YASUZUMI, G., and Y. OBATA: Electron microscopy of human dentin. *J. dent. Res.* **34**, 808—813 (1955).

Dr. HANS-JÜRGEN HÖHLING, Abtg. für Medizinische Elektronenmikroskopie
an der Universität, Münster i. Westf.

Aus der Elektronenmikroskopischen Abteilung des Anatomischen Institutes
der Universität Kiel (Direktor: Prof. Dr. W. BARGMANN)

ÜBER DEN ORT DER BILDUNG DES MUKOPOLYSACCHARID-
PROTEINKOMPLEXES IM KNORPELGEWEBE* **
ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UND HISTOCHEMISCHE
UNTERSUCHUNGEN

Von

KARL-HEINRICH KNESE und ANNE-MARIE KNOOP

Mit 30 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Juni 1960)

Inhalt	Seite
I. Einleitung	201
II. Material und Methode	202
III. Befunde	203
1. Elektronenmikroskopische Untersuchung des Perichondriums	203
2. Topochemische Befunde	208
a) Rinderfeten unter 100 mm SSL S. 209. — b) Rinderfeten über 100 mm SSL S. 212.	
3. Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Zellen des Epiphysenknorpels	222
4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entstehung des Vorknorpels	236
IV. Diskussion	239
1. Die Ultrastruktur des Epiphysenknorpels	239
2. Das endoplasmatische Retikulum in Chondroblasten und Chondrocyten	241
3. Synthese der MPS	243
4. Das färberische Verhalten der Chondroblasten und Chondrocyten	245
5. Die organische Interfibrillärsubstanz, ihre Zusammensetzung und ihre färberische Darstellung im Schnitt	247
6. Die Stoffabgabe an die Interzellulärsubstanz durch Chondroblasten und Chondro- cyten	250
Zusammenfassung	251
Literatur	252

I. Einleitung

Im Folgenden sollen die Ergebnisse elektronenmikroskopischer und histochemischer Untersuchungen über die Chondro- bzw. Osteogenese unter besonderer Berücksichtigung der Bildung des Mukopolysaccharid-(MPS-)Proteinkomplexes mitgeteilt werden. Beide Vorgänge sind durch die Bildung extrazellulärer Substanzen ausgezeichnet, nämlich von Fasern und einer organischen Interfibrillärsubstanz. Ferner kommt es zur Ablagerung anorganischen Materials im Knochen. Der Faserbildung und der Einlagerung anorganischer Substanzen wurden bereits zahlreiche morphologische Untersuchungen gewidmet, der Bildung der *organischen Interfibrillärsubstanz* bisher jedoch nicht. Da die organische Interfibrillärsubstanz

* Vorläufige Mitteilung erfolgte am 20. 10. 59 auf der 9. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Freiburg i. Br.
** Die Untersuchungen wurden mit der dankenswerten Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

im Knorpel einen relativ hohen Prozentsatz ausmacht, erscheint der sich entwickelnde Knorpel für ein morphologisches Studium des *Ortes der Synthese des MPS-Proteinkomplexes* besonders geeignet (DORFMAN 1954). Der Anteil der Chondroitinschwefelsäure im Knorpel beträgt 20—30% der Trockensubstanz und etwa 5% der Frischsubstanz bei einem Wassergehalt von annähernd 75% (MIYAZAH 1934, MEYER und SMITH 1937, EINBINDER und SCHUBERT 1950, EICHELBERGER u. Mitarb. 1951, LOEVEN 1955).

Bereits bei der Schilderung der periostalen Osteogenese (KNESE und KNOOP 1958) wurde auf eine Umgestaltung des sog. endoplasmatischen Retikulum der Osteoblasten in Nachbarschaft des präossalen Gewebes hingewiesen. Wir sprachen die Vermutung aus, daß diese Umgestaltung mit den amorphen Teilen des präossalen Gewebes in Zusammenhang stünde. Ein ähnliches Verhalten des Ergastoplasma konnten wir, z. T. in verstärktem Maße, in Chondroblasten und bestimmten Chondrocyten feststellen.

Im Anschluß an diese Beobachtungen haben wir elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Tibia von Rattenfeten, topochemische Untersuchungen an Rattenfeten und am Metacarpus von Rinderfeten über die Knorpelbildung durchgeführt.

Ausführungen verschiedener Autoren (PORTER 1953, SJÖSTRAND 1956, PALADE 1956, HAGUENAU 1958, OBERLING 1959) zeigen, daß die Terminologie der zu diskutierenden submikroskopischen Strukturen uneinheitlich ist. Da eine Stellungnahme zur Nomenklatur nicht in den Rahmen dieser Darstellung gehört, werden die Termini *Ergastoplasma* und *endoplasmatisches Retikulum* parallel gebraucht. Mit beiden Bezeichnungen werden Membranen gekennzeichnet, die einen Raum umgrenzen und auf der „Lumen“-seite glatt sind. Für diesen Raum wählen wir die Benennung *intermembranöser Spalt* oder mit PALADE und PORTER (1954) *Zisterne*. Auf der dem Hyaloplasma zugewandten Seite tragen die Membranen Palade-Granula. Im Grundplasma (Hyaloplasma) können freie, d. h. nicht an Membranen gebundene Palade-Granula liegen.

In der Benennung der Zonen des *Epiphysenknorpels* folgen wir KASSOWITZ (1879, vgl. KNESE 1957), dessen Bezeichnungen mit geringen Änderungen, Zusätzen oder Vereinfachungen fast allgemein gebraucht werden. Wir unterscheiden demgemäß: 1. Perichondrale Appositionszone; 2. Gelenkknorpel; 3. hyaliner Epiphysenknorpel; 4. Zone der (einseitigen) Zellproliferation; 5. Säulenknorpel; 6. Zone der hypertrophen Knorpelzellen; 7. Zone des mineralisierten Knorpels; 8. Eröffnungszone.

Die Zone 3. entspricht in der Lagerung der Zellen, Menge der Interzellularsubstanz usw. dem hyalinen Knorpel, so daß in der Literatur entweder nur vom Hyalinknorpel gesprochen bzw. auf eine spezielle Bezeichnung verzichtet wird. Die Beifügung Epiphysenknorpel weist auch darauf hin, daß diese Zone etwa dem Territorium des Epiphysenkernes gleichkommt. KASSOWITZ (1897) spricht hier von der Zone des allseitig wachsenden Knorpels. CAMERON und ROBINSON (1958) nennen diesen Bezirk intermediäre Zone.

II. Material und Methode

Elektronenmikroskopisch wurde die proximale Tibiaepiphyse von Rattenfeten von 14,3—32,4 mm SSL untersucht. Die Gewebstückchen wurden in 1- bzw. 2%iger isotonischer und gepufferter (pH 7,2) Osmiumsäurelösung bzw. in 10% Formol fixiert, in Alkohol entwässert und mit Phosphorwolframsäure gefärbt. Einbettung in einem Gemisch aus 10 Teilen Methacrylsäure-butylester und 1 Teil Methacrylsäure-methylester unter Zusatz von 2% Percadox oder in Vestopal W (Originalrezept Dr. KELLENBERGER). Behandlung mit Diastase bzw. Hyaluronidase nach dem Fixieren und Wässern. Alle Schnitte wurden mit dem Porter-Blum-Mikrotom hergestellt. Die Aufnahmen wurden mit einem Siemens-Elmiskop I (Strahlspannung 80 kV) gemacht.

Die topochemischen Untersuchungen wurden z. T. am gleichen Material, im übrigen am Metacarpus von Rinderfeten von 9 mm SSL an durchgeführt. Fixierung: Alkohol 100%,

Carnoy, Formol 1:4. Paraffinschnitte. Färbungen (Methoden bei ROMEIS 1948, LIPP 1954, GEDIGK 1956): Azan (nach HEIDENHAIN), Eisenhämatoxylin (nach HEIDENHAIN). — *Nukleinsäuren*: Feulgen-Reaktion, Gallocyanin. — *Pufferfärbung*: mit Methylenblau bzw. Orange G (DEMPSEY). — Reaktionen auf *KH* bzw. *MPS*: Glykogenfärbung (BEST), PAS (McMANUS), BTS-Geaktion (GRAUMANN), Färbung mit kolloidaler Eisenlösung nach HALE (CASSELMANN 1959), Polysaccharid-Eisen-Reaktion (GRAUMANN 1958), modifizierte Hale-Färbung nach MÜLLER (1955/56), Astrablau. — *Metachromasie*: Toluidinblau 0,5% in Alkohol 20% (HOYER), Toluidinblau in wäßriger Lösung bei verschiedenem pH (SCHUBERT 1956), Pseudoisocyanin (SCHIEBLER 1958). — *Darstellung der Proteine*: Millon-Reaktion (BENSLEY und GERSH), SH-Gruppen (BARNETT und SELIGMAN), Ninhydrinreaktion, Arginin-Sakaguchi (BAKER), Diazo-reaktion (LISON).

Soweit die Farbreaktionen es gestatten, wurde eine Kontrolle mit *enzymatischer Hydrolyse* durchgeführt (Hyaluronidase, Ribonuclease, Desoxyribonuclease, Diastase, Pepsin).

Eindecken der Präparate in Eukitt bzw. Caedax.

III. Befunde

1. Elektronenmikroskopische Untersuchung des Perichondriums

In den peripheren Anteilen des *Perichondriums* bzw. *Periostes*, der zukünftigen Fibroelastika, liegen den Fibroblasten ähnliche Zellen (Abb. 1), lange spindelförmige Elemente mit einem großen stäbchenförmigen Kern. An der Längsseite des Kerns befindet sich ein schmaler Cytoplasmasaum, der in die Cytoplasmahauben beiderseits des Kernes übergeht. Der Kern ist nicht selten exzentrisch gelegen. Das Chromatin des Kernes ist abgesehen von geringfügigen Verdichtungs-zonen an der Kernmembran annähernd gleichmäßig verteilt. Kleinere Nukleolen von geringer Dichte können auftreten. Bei asymmetrischer Kernlage erscheinen im Cytoplasma des kleineren Zellpoles einige Granula, aber nur wenige Membranen des endoplasmatischen Retikulum, soweit sie nicht ganz fehlen. Auch Mitochondrien kommen spärlich vor. Im größeren Zellabschnitt findet man außer isolierten Granula eine Schar mit Granula besetzter Doppelmembranen. Diese Membranen sind in den Zellen des Periost parallel zur Längsrichtung der Zelle orientiert. In den peripheren Zellen des Periost verlaufen 4—7 derartiger Doppelmembranen über längere Strecken hin parallel zueinander. In den entsprechenden Zellen des Perichondrium stellen die Doppelmembranen kürzere Gebilde von weniger strenger Ausrichtung dar, eingelagert in ein reichlich entwickeltes Grundplasma mit Palade-Granula. Der Abstand der Membranen voneinander ist bei beiden Zellarten gering; er bleibt annähernd konstant, d. h. die Zisternen haben eine gleichbleibende Weite. Die Zisternen sind von einer homogenen Substanz mit größerer elektronenmikroskopischer Dichte als das Grundplasma erfüllt. Die erwähnten Zellen enthalten eine nur geringe Zahl kleinerer Mitochondrien. Die Beziehungen der Zellen in der peripheren Lage des Periost bzw. Perichondrium zu den Kollagenfibrillen im interzellulären Raum mögen außer Betracht bleiben.

Bei der Metamorphose dieser Zellen zu *Prächondroblasten* und *Chondroblasten* nimmt der Zelleib eine rhombische oder ovoide Form an, die Kerne gewinnen ebenfalls eine ovoide Gestalt. Die Zellkerne der Chondroblasten in Knorpelnähe können Einkerbungen der Oberfläche oder Lappungen aufweisen. Mit der Reifung der Chondroblasten verliert sich die gleichmäßige Verteilung des Chromatins; nunmehr treten einige größere Brocken auf, in feinverteiltes Chromatin eingebettet. Ein ähnliches Bild zeigen in stärkerer Ausbildung die Kerne der Osteoblasten (KNESE und KNOOP 1958). Schließlich findet man in den Kernen der Chondroblasten in der Regel einen dichter strukturierten Nukleolus.

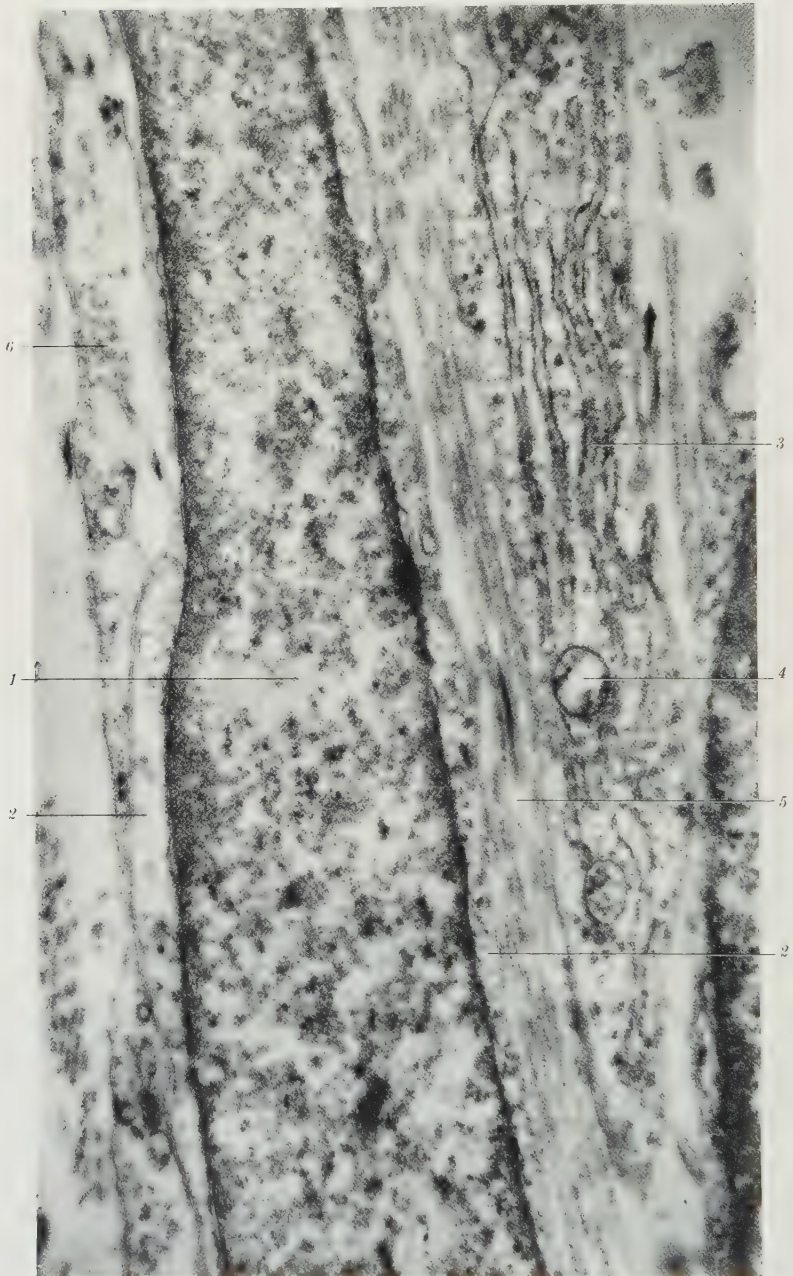


Abb. 1. Langgestreckte fibroblastenähnliche Zellen aus dem peripheren Anteil des Perichondrium der Ratte. 1 Kern einer Zelle; 2 Hyaloplasma; 3 endoplasmatisches Retikulum der benachbarten Zellen mit gering erweiterten Zisternen; 4 Mitochondrium; 5 Interzellularraum mit längsgeschnittenen und quergestreiften Fibrillen; 6 quergeschnittene Fibrillen. Vergr.: 24 500

Ein beachtlicher Unterschied der Chondroblasten gegenüber den Fibroblasten bzw. Prächondroblasten besteht in der Ausgestaltung des Ergastoplasma. Die *Zisternen* werden sinusartig ausgeweitet. Da ihre Erweiterungen zunächst in

einem gewissen Abstand von einander auftreten, entsteht ein perlschnurartiges Profil. Die Sinus sind mit einer homogenen Substanz erfüllt. Wir konnten weiterhin Beziehungen des Ergastoplasma zu Strukturelementen beobachten, die wir für Golgi-Elemente halten (Abb. 2). Es handelt sich um in einem Felde gelagerte größere, ovoide, elektronenmikroskopisch dichte Körperchen und Bläschen, die

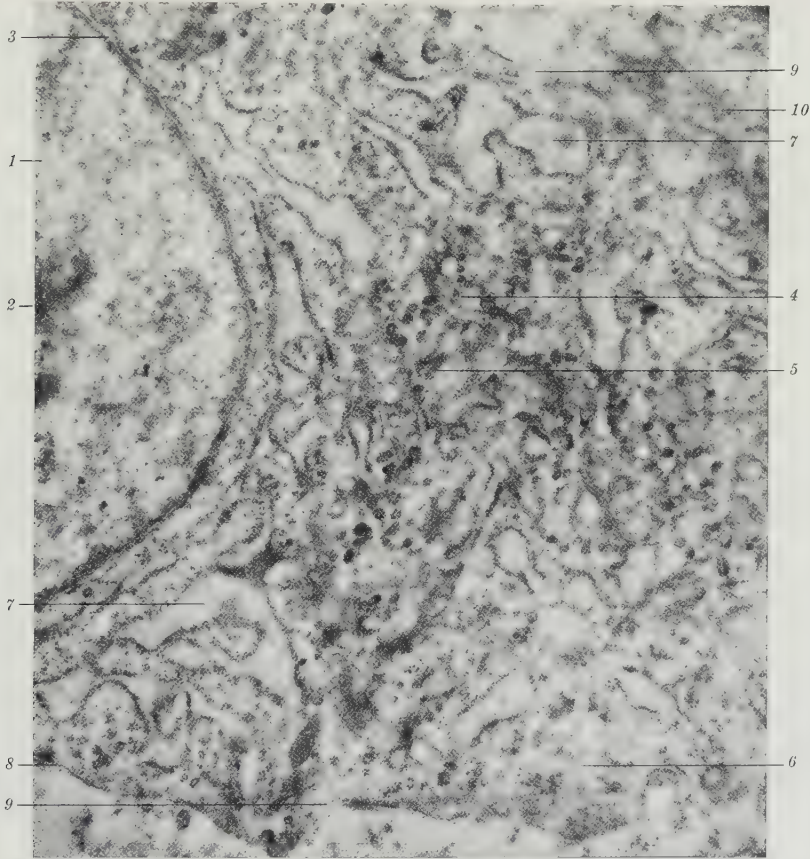


Abb. 2. Chondroblast aus dem Perichondrium der Ratte. 1 Zellkern; 2 Nukleolus; 3 Kernmembran; 4 Golgi-Feld mit dunklen Körpern und Vakuolen; 5 kurze glatte Golgi-Lamellen; 6 Hyaloplasma; 7 perlschnurartig erweiterte Zisternen umgeben von Membranen des endoplasmatischen Retikulum; 8 scharf konturiertes Plasmalemm; 9 unscharf und unterbrochen dargestelltes Plasmalemm; 10 interzelluläre Fibrillen, eingebettet in Interfibrillärsubstanz. Vergr.: 23000

im allgemeinen leer erscheinen. In Chondroblasten treten parallele, nicht mit Granula besetzte Golgi-Membranen seltener auf (s. u. Chondrocyten). Die Ergastoplasamembranen tauchen in die Peripherie dieses Golgi-Feldes ein oder dringen gar bis in dessen Mitte vor. Das Grundplasma wird durch die Erweiterung der Zisternen bis auf eine Breite von 3000—4000 Å zum Teil auf so schmale Abschnitte beschränkt, daß sich mitunter benachbarte Membranpaare mit den Palade-Granula berühren. In etwas umfangreicheren Spalten sind isoliert gelegene Palade-Granula auszumachen. Mit Palade-Granula besetzte Membranen können rundlich gestaltete Mitochondrien eng umschließen (Abb. 3).

Schließlich treten im Perichondrium Zellen auf, deren Zelleib größtenteils von Zisternen eingenommen wird (Abb. 3). Das Hyaloplasma ist auf kleinere Areale

beschränkt, die von Zisternen umschlossen sind. Neben Chondroblasten mit der geschilderten Umgestaltung des Ergastoplasma treten Zellen auf, deren Cytoplasma keine oder nur wenig Doppelmembranen enthält. Dagegen finden sich allenthalben im Grundplasma verteilte Palade-Granula, einzelne Mitochondrien

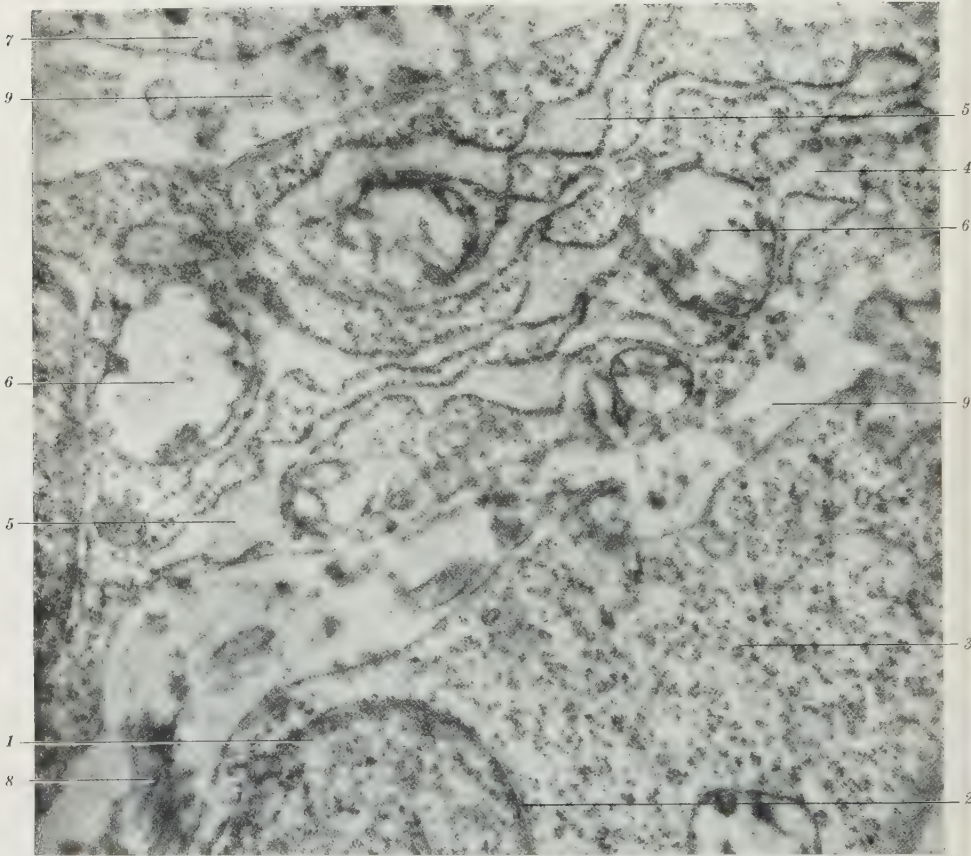


Abb. 3. Chondroblast aus dem Perichondrium der Ratte. 1 Zellkern; 2 Kernmembran; 3 Hyaloplasma des einen Chondroblasten angefüllt mit Palade-Granula ohne Membranen des endoplasmatischen Retikulum; 4 intermembranöses Hyaloplasma mit Palade-Granula; 5 perlschnurartig erweiterte Zisternen; 6 Mitochondrien in engem Kontakt mit Membranen des endoplasmatischen Retikulum; 7 angeschnittene Zellfortsätze; 8 interzelluläre Fibrillen; 9 Interzellularraum. Vergr.: 30 000

und osmiophile, z. T. sternförmige Einlagerungen, vermutlich aus Fettstoffen bzw. Lipoiden bestehend.

In oder unmittelbar vor der Knorpelbildungsfront wird der *Interzellularraum* merklich breiter. Die Chondroblasten sind in diesem Bezirk von sehr wechselnder Gestalt. Sie besitzen eine Reihe plumper Fortsätze, deren Anschnitten man immer wieder begegnet. Im Zelleib liegen die erweiterten, netzartig miteinander verbundenen Zisternen (Abb. 4). Auch das Grundplasma oder Hyaloplasma hat an Volumen zugenommen.

Die Verbreiterung des Interzellularraumes beruht möglicherweise auf einer Stoffproduktion der Zellen. Es liegt daher nahe, nach morphologischen Zeichen

einer solchen Stoffabgabe zu fahnden. Die Ausschleusung der homogenen Substanz aus den Zisternen und den Zellen ist elektronenmikroskopisch nur unvollständig zu erfassen. Die Ausschüttung einer homogenen Substanz aus der Zelle scheint im allgemeinen im Zusammenhang mit der Bildung der Kollagenfibrillen

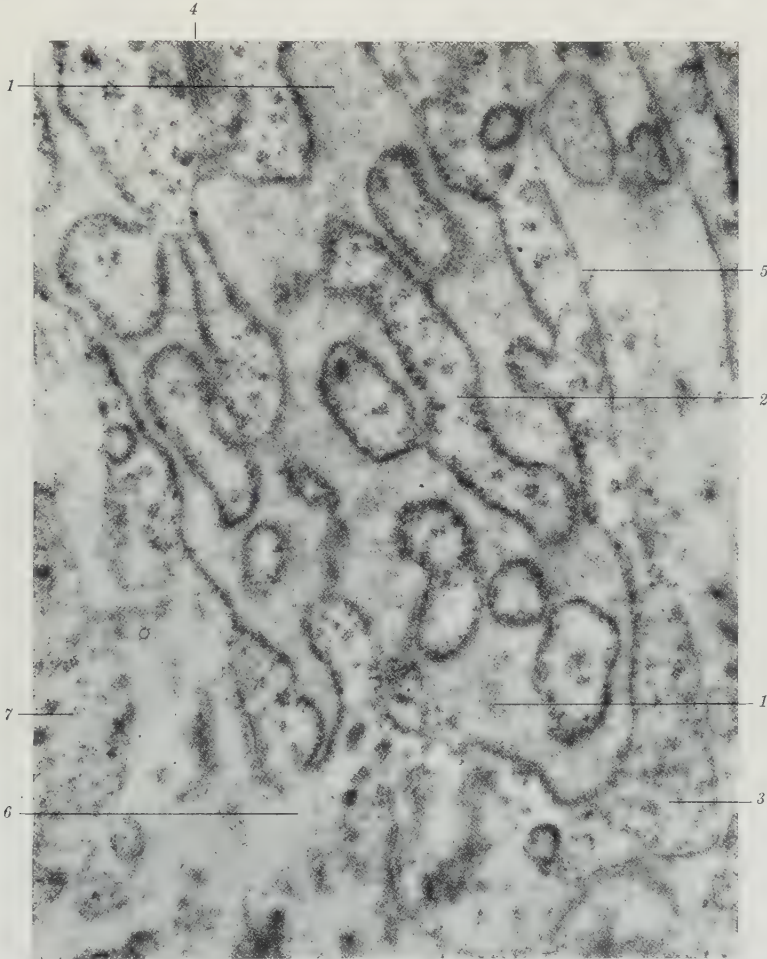


Abb. 4. Zellkörper mehrerer Chondroblasten aus dem Perichondrium der Ratte. 1 Stark erweiterte kommunizierende Zisternen; 2 auf enge Bezirke beschränktes Hyaloplasma; 3 hyaloplasmatischer Randsaum; 4 Golgi-Lamellen; 5 scharf konturiertes Plasmalemm mit einigen Unterbrechungen; 6 unscharf dargestelltes Plasmalemm; 7 Hyaloplasma eines zweiten Chondroblasten, angefüllt mit Palade-Granula. Vergr.: 34 000

zu erfolgen. Im Interzellularraum sind nämlich verschieden große Gruppen von Fibrillen in dichter Anfügung an die Chondroblasten zu beobachten (Abb. 5). Diese Fibrillen sind in elektronenmikroskopisch etwas dichtere, nicht geformte Substanz eingebettet.

Die Chondroblasten besitzen ein gut ausgebildetes *Plasmalemm*. In der Nachbarschaft dieser extrazellulären Fibrillengruppen erscheint es jedoch häufig unscharf begrenzt und stellenweise unterbrochen. Ein Gleiches gilt für die ihm

benachbarten Membranen des endoplasmatischen Retikulum; auch sie können auf kurze Strecken unterbrochen sein. Daneben erscheinen breitere, undeutlich konturierte Membranbezirke. Auch die Dichte dieser Membranabschnitte des endoplasmatischen Retikulum ist geringer als an andern Orten. Die Frage, ob die beschriebenen Bilder der Zellmembranen auf eine Änderung des Membranaufbaues hinweisen bzw. ob eine Artefaktbildung vorliegt, wird auf S. 250 behandelt.

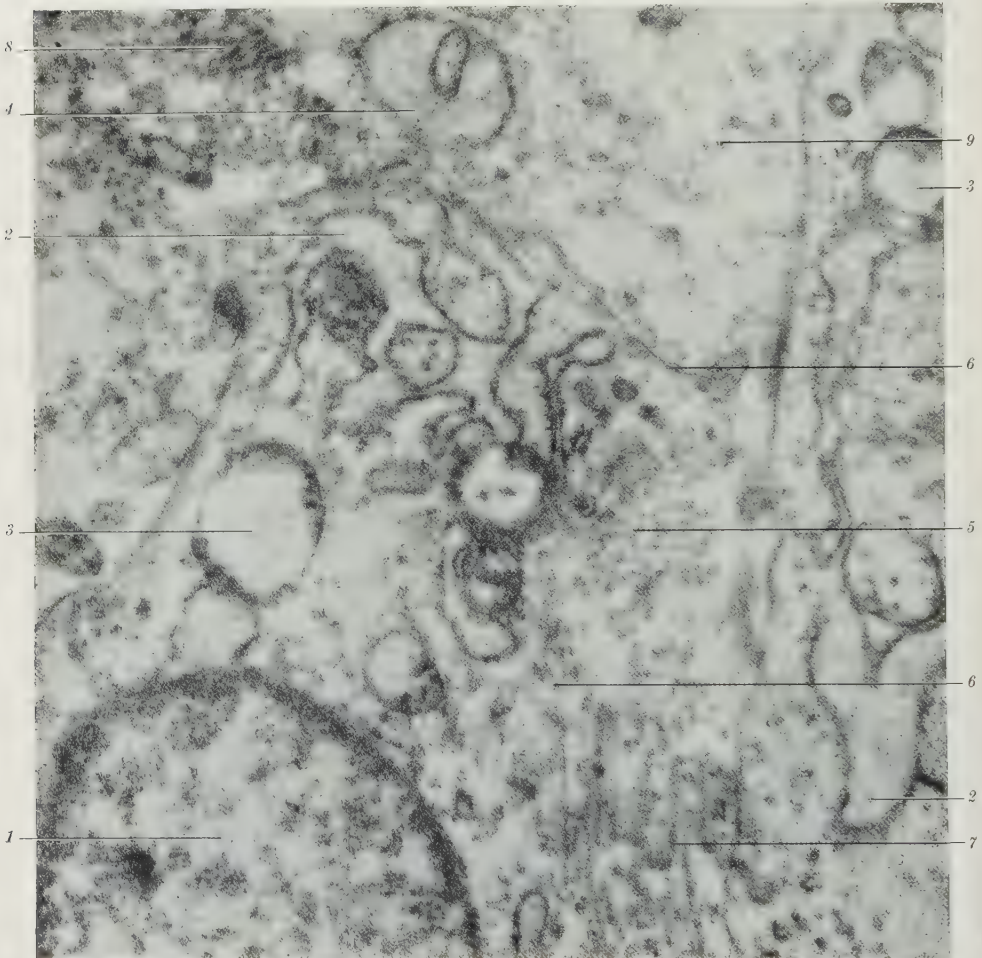


Abb. 5. Knorpelnaher Chondroblast. 1 Zellkern; 2 Zisternen in Kommunikation; 3 Mitochondrien; 4 angeschnittene Zellfortsätze; 5 Fibrillenquerschnitte, in deren Nachbarschaft die Zellmembran nicht kenntlich ist; 6 unmittelbar anschließendes scharf konturiertes Plasmalemm; 7 Fibrillenlängsschnitte; 8 Fibrillenquerschnitte; 9 Interzellularraum. Vergr.: 31 500

2. Topochemische Befunde

Den elektronenmikroskopischen Befunden sind topochemische, an Ratten- und Rinderfeten gewonnene, an die Seite zu stellen.

An den Rattenfeten wurden nur Stichprobenuntersuchungen durchgeführt, da der größere Teil unseres Materials für elektronenmikroskopische Untersuchungen herangezogen wurde. Zum Vergleich der Knorpel- und Knochenbildung bei einem größeren Säuger über eine längere

Wachstumsphase wählten wir das Rind. Es lag daher nahe, dieses Rindermaterial auch für die vorliegenden Untersuchungen auszuwerten. Gleichartige Beobachtungen wie an Ratten sind an Rinderfeten von weniger als 100 mm SSL zu machen. Die Farbreaktionen an Rinderfeten über 100 mm SSL fielen zum Teil anders als bei den Rattenfeten (KNESE 1959) aus (vgl. hierzu S. 212). Die Befunde wurden an Serienschnitten erhoben, so daß gleichartige methodische Bedingungen vorliegen.

a) *Rinderfeten unter 100 mm SSL.* Bei Anfärbung mit *Toluidinblau* gibt das Perichondrium von Ratten- und kleineren Rinderfeten keine metachromatische Reaktion. Erst die Interzellulärsubstanz der Appositionszone zeigt eine deutliche metachromatische Färbung. Die Chondrocyten im Bereich zwischen hyalinem Epiphysenknorpel und hypertrophem Knorpel weisen eine zunehmende Stärke der metachromatischen Reaktion des Cytoplasmas auf. Nach Hydrolysierung mit Hyaluronidase verschwindet die Metachromasie der Knorpelzellen vollständig, die der Interzellulärsubstanz weitgehend.

Die von uns benutzte alkoholische Toluidinblaulösung hat einen p_H von 3,8. Wir haben weiterhin Färbungen mit *Toluidinblau* in wäßriger Lösung bei *verschiedenem* p_H durchgeführt. Bei einem p_H von 2,6 färbt sich die Interzellulärsubstanz der Appositionszone orthochromatisch. Erst die zentralen Abschnitte des hyalinen Epiphysenknorpels reagieren schwach metachromatisch. Die Metachromasie der Interzellulärsubstanz nimmt zum hypertrophen Knorpel hin zu. Eine Hydrolyse mit Hyaluronidase läßt die Metachromasie in dem p_H -Bereich von 2,6—4,1 völlig verschwinden. Aber auch nach Vorbehandlung mit Ribonuclease, Desoxyribonuclease und Diastase nimmt die Metachromasie der Interzellulärsubstanz im Proliferationsknorpel stärker, im hypertrophen Knorpel weniger oder kaum merklich ab.

Der Zellkörper der knorpelnahen Chondroblasten färbt sich mit Toluidinblau nur bei p_H 4,1 diffus schwach metachromatisch an. Die Osteoblasten reagieren metachromatisch vereinzelt bereits bei p_H 2,6, regelmäßig und kräftiger bei 3,6. Die Verteilung der Metachromasie im Zelleib der Osteoblasten erscheint ähnlich wie die Methylenblau-metachromasie netzartig, d. h. zwischen den metachromatischen Bezirken liegen hellere Cytoplasmateile.

Im Zelleib der Knorpelzellen treten mit Ausnahme jener der Appositionszone bei Färbung mit Toluidinblau in einem p_H von 2,6 *Granula* von etwa 1,0—3,0 μ Größe auf, die sich stärker als die Interzellulärsubstanz metachromatisch anfärben (Abb. 6). Die Granula zeigen einen roten Farbton, eine γ -Metachromasie (MICHAELIS 1947, PEARSE 1953, KRAMER et al. 1955), die Interzellulärsubstanz einen violetten, die β -Metachromasie. Diese metachromatischen Granula sind unregelmäßig über den Zelleib verteilt; sie liegen seltener dem Kern unmittelbar an. Die Granula der peripheren Chondrocyten sind etwas kleiner, z. T. unter 1 μ , und ihre Metachromasie ist schwächer als in den zentral gelegenen Zellen. Die Metachromasie der Granula in den Zellen des hyalinen Epiphysenknorpels ist bei einem p_H von 4,1 merklich geringer, jedenfalls schwächer als die der Interzellulärsubstanz. Der Durchmesser der Granula beträgt im Mittel 5 μ und variiert von 2—8 μ . Die Granula sind nach Behandlung mit Hyaluronidase und Diastase nicht mehr darstellbar; ihre Metachromasie ist nach Ribonuclease unverändert, nach Desoxyribonuclease etwas schwächer.

Die Zellen des *Säulenknorpels* besitzen beiderseits in Längsausdehnung der Zelle dem Kern benachbart stark metachromatisch färbbare Hauben, deren

Metachromasie von pH 2,6—4,1 an Intensität zunimmt. In diese Hauben sind größere, scharf begrenzte orthochromatisch reagierende Bezirke eingelassen. Die Metachromasie verschwindet nur nach Hydrolyse mit Hyaluronidase und Diastase.

Das Cytoplasma der Zellen des *hypertrophen Knorpels* zeigte bei Toluidinblaufärbung in dem pH 2,6—4,1 eine zunehmende Stärke der Metachromasie. Es erscheint schließlich in schwarz-violetter oder braun-schwärzlichem Ton. Das metachromatische Cytoplasma bildet einen perinucleären Hof, von dem Züge an die Knorpelkapsel herantreten. Auch diese Toluidinmetachromasie verschwindet nur nach Behandlung mit Diastase bzw. Hyaluronidase.

Bei Färbung mit *Pseudoisocyanin* stellt sich das Perichondrium überwiegend orthochromatisch dar. Einzelne, kleinere metachromatische Bezirke gehören wohl dem Zelleib von Knorpelzellen an. Die Interzellulärsubstanz des Knorpels und der Zellkörper der hypertrophen Knorpelzellen ist stark, der Zelleib der übrigen Chondrocyten im allgemeinen schwach oder undeutlich metachromatisch, angefärbt. Nach Vorbehandlung mit Hyaluronidase tingiert sich das Perichondrium nunmehr rein orthochromatisch. Die Interzellulärsubstanz des Knorpels ist bis auf die sog. Knorpelkapseln vollständig orthochromatisch angefärbt. Die Knorpelzellen der verschiedenen Bereiche der Epiphyse verhalten sich gegenüber Pseudoisocyanin nach Hyaluronidaseeinwirkung verschieden. Die hypertrophen Knorpelzellen bleiben noch schwach metachromatisch. Im Proliferationsknorpel sind nur noch einzelne Zellkörper schwach, im Säulenknorpel dagegen durchweg recht kräftig metachromatisch gefärbt.

Mit *Astrablau-Kernechtrot* färbt sich die Interzellulärsubstanz des Knorpels und des fädig strukturierten Cytoplasmas der Chondrocyten blau. Im Perichondrium und Periost treten neben rot angefärbten auch dunkelviolette Kerne auf. Die Kerne der Chondrocyten sind überwiegend rot, von Zeit zu Zeit auch mehr violett tingiert.

Mit der Methode von HALE (nach CASSELMAN 1959) konnten wir in den tiefen Schichten des Perichondriums nur eine zarte Blaufärbung im Cytoplasma einzelner Zellen feststellen. Wie aus älteren Untersuchungen bekannt (SCHAFER 1930), können Zellgrenzen im Perichondrium lichtmikroskopisch nicht beobachtet werden. Mitunter tritt in unseren Präparaten ein perinukleärer heller Hof auf, so daß an eine Verlagerung des Hale-positiven Materials unter Umständen bis in den Interzellularraum gedacht werden kann. In dem Appositionsknorpel liegen etwas dunkler gefärbte Substanzen eindeutig interzellulär. Die Anfärbung der hyalinen Interzellulärsubstanz wird sehr bald blauschwarz; sie betrifft den hyalinen Epiphysenknorpel und die subperichondralen Schichten des Säulen- und hypertrophen Knorpels. Die zentralen Teile dieser beiden Epiphysenabschnitte färben sich dagegen mit Safranin goldorange. Das Cytoplasma der Zellen des Epiphysenknorpels erscheint zartgrau, des Säulenknorpels fast schwarz und des hypertrophen Knorpels hellblau.

Die *kolloidale Eisenreaktion* nach MÜLLER (1955/56) ergibt im tieferen Anteil des Perichondrium eine schwache Blaufärbung der Interzellulärsubstanz. Die hyaline Interzellulärsubstanz des Appositionsknorpels wird dunkelblau. Ein gleiches Bild bieten die oberflächlichen Schichten des Säulen- und hypertrophen Knorpels. In den tieferen Abschnitten des hyalinen Epiphysenknorpels tritt diese Dunkelblaufärbung nur an den Knorpelkapseln auf, während sich dazwischen kaum gefärbte Substanz befindet, in der einige dunklere Granula zu erkennen sind. Im Proliferations- und Säulenknorpel nimmt diese praktisch ungefärbte Interzellulärsubstanz erheblich an Masse zu. Die Knorpelkapseln, besonders des hypertrophen Knorpels, sind dünn und kaum von den peripheren Cytoplasmateilen zu unterscheiden. Das Cytoplasma aller Chondrocyten ist diffus schwarz angefärbt.

Die Eisenreaktion nach MÜLLER (1955/56) führt nach Hyaluronidasebehandlung zu einer gleichmäßigen mittelstarken Blaufärbung der Interzellulärsubstanz ohne Absetzung der Knorpelkapsel. Die Interzellulärsubstanz des hypertrophen Knorpels ist etwas kräftiger getönt. Das Cytoplasma der Chondrocyten ist ungefärbt. Nach Vorbehandlung mit Ribonuclease färben sich nur noch Teile der Knorpelkapseln an. Die Granula sind aus der Interzellulärsubstanz verschwunden. Nur die gelenknahen Teile des neugebildeten Knorpels sind dunkel angefärbt. Nach Einwirkung von Ribonuclease nimmt das Cytoplasma der hypertrophen Knorpelzellen eine tief dunkelblaue Färbung an. Nach Hydrolyse mit Desoxyribonuclease bleibt die Interzellulärsubstanz der Appositionszone fast durchweg ungefärbt. In dem übrigen Teil des Epiphysenknorpels erscheinen die Knorpelkapseln als schmale, aber deutlich begrenzte Bänder. Die zwischen den Knorpelkapseln gelegene Interzellulärsubstanz ist im Proliferations- und im Säulenknorpel hell, im hypertrophen Knorpel etwas dunkler. Die Grenze zwischen beiden Farbtönen verläuft wie bei der Hale-Färbung bogenförmig, wobei die Höhe des Bogens zu den Gelenken hinweist. Das Cytoplasma der hypertrophen Knorpelzellen ist weiterhin tief dunkelblau tingiert. Nach Pepsinbehandlung treten die Knorpelkapseln als relativ schmale Bildungen hervor, allerdings etwas breiter als nach Desoxyribonuclease-Digestion, so daß der Abstand zwischen benachbarten Knorpelkapseln verringert erscheint. Weiterhin besteht ein Färbungsunterschied zwischen der Interzellulärsubstanz des Proliferations- und Säulenknorpels sowie des hypertrophen Knorpels; letzterer tritt in dunklerer Tönung hervor. Die hypertrophen Knorpelzellen sind wiederum intensiv dunkelblau angefärbt.

Bei der *Polysaccharid-Eisen-Reaktion* von GRAUMANN (1958) färbt sich das Cytoplasma der knorpelnahen Chondroblasten an den Enden des Skeletstückes blau. In diesen Gebieten ist der Appositionsknorpel durch dichte Aneinanderlagerung der dunkelblauen Knorpelkapseln ausgezeichnet, das Cytoplasma der von diesen Kapseln umgebenen Knorpelzellen bleibt ungefärbt. Zur Diaphysenmitte hin ist eine färberische Abgrenzung zwischen Cytoplasma der Chondrocyten und zugehörigen Knorpelkapseln häufig nicht möglich; letztere werden von einer hellen bzw. schwach angefärbten Interzellulärsubstanz umgeben. In der Tiefe des Knorpels erscheinen die Knorpelkapseln als schmale Gebilde, die in eine hellblau gefärbte mit dunklen Granula versehenen Interzellulärsubstanz eingebettet sind. Das Cytoplasma der Zellen des Säulen- und hypertrophen Knorpels ist in verhältnismäßig dunklem Blau tingiert.

Die Anfärbung des Cytoplasmas der Chondroblasten mit *Methylenblau* ist beim pH 3,6 gering, nimmt bei 4,1 zu und ist bei 4,7 recht kräftig, allerdings nicht so stark wie diejenige der Zellkerne. Der Zelleib der zentral gelegenen Chondroblasten reagiert bei dem pH 4,7 wie die Interzellulärsubstanz des Knorpels schwach metachromatisch. Die metachromatische Färbung tritt beim pH 4,1 nur noch interzellulär auf; sie beginnt bei 3,6 erst im Säulenknorpel im Grenzbereich zum hypertrophen Knorpel. Nach Hydrolyse mit Hyaluronidase ist die Metachromasie der Interzellulärsubstanz verschwunden. Das Cytoplasma der Chondroblasten und der Zellen des Gelenkknorpels erscheint nach Hyaluronidasebehandlung beim pH 4,1 unverändert, bei 3,6 schwächer blau gefärbt. Der Zelleib der Zellen des Säulen- und hypertrophen Knorpels ist bei pH 4,7 noch leicht metachromatisch, ab 4,1 ungefärbt. Das Cytoplasma der Chondroblasten ist bei Methylenblau-

färbung im pH 4.7 nach Ribonucleasewirkung ungefärbt, der Zelleib der hyalinen Knorpelzellen reagiert schwach, der der hypertrophen Knorpelzellen stark metachromatisch.

Mit *Gallocyanin* lassen sich im Perichondrium und Knorpel nur die Kerne deutlich anfärben. Das Cytoplasma der Zellen beider Gebiete zeigt keine oder nur eine wechselnde und schwache Grautönung.

Bei Anfärbung mit *PAS* erscheinen erst in den Zellen des hyalinen Epiphysenknorpels abgesehen von einer mehr diffusen Anfärbung des Cytoplasmas Körnchen von $0,8-3,5\mu$ Durchmesser. Diese Granula verschwinden in den Zellen des Säulenknorpels und treten in den hypertrophen Zellen wieder auf. Die Granula und das diffus gefärbte Cytoplasma nehmen eine hofartige, den Kern der hypertrophen Knorpelzellen umgebende Zone ein. Von diesem Kernhof erstrecken sich einzelne Cytoplasmafortsätze bis zur Knorpelkapsel, die innen mit einer PAS-positiven Schicht ausgekleidet ist. Auf diese Weise entsteht eine radartige Struktur der Knorpelzelle ähnlich derjenigen, die bei Toluidinblaufärbung anzutreffen ist. Durch Diastasebehandlung verschwinden die PAS-positiven Zelleinlagerungen. Nach Diastaseeinwirkung tritt aber eine schwache Anfärbung der Interzellularsubstanz des hyalinen Epiphysenknorpels und eine stärkere derjenigen des hypertrophen Knorpels auf. Die Interzellularsubstanz des Appositionsknorpels reagiert schwächer.

PAS-positive Granula, wie sie verschiedentlich beschrieben wurden (vgl. Diskussion), konnten von uns in den Zellen des Perichondrium nicht beobachtet werden. Am Metakarpus des Rindes treten PAS-positive Granula nur in den Periostzellen auf (KNESE 1959).

Das Bild der Verteilung der in Knorpelzellen eingelagerten Granula ist bei *BTS-Färbung* etwas anders als bei der *PAS-Färbung*. Den Zellen des Perichondriums fehlen wiederum Granula. Die Zellen des hyalinen Epiphysenknorpels bis dicht unter den Gelenkknorpel enthalten dagegen Granula von $0,8-3,5$, selten bis $6,5\mu$ Durchmesser. BTS-positive Körnchen sind auch im Proliferationsknorpel sowie in den meisten Zellen des Säulenknorpels aufzufinden; sie fehlen nur in wenigen Zellen der Mitte dieser Zone. Regelmäßig kommen aber BTS-positive Granula im Säulenknorpel in unmittelbarer Nachbarschaft der hypertrophen Zellen vor.

Mit der Bicolorfärbung nach VAN DUJN (1954) färben sich die Zelleiber der peripheren Perichondriumzellen schwach rot an, die Interzellularsubstanz des Appositionsknorpels ist kräftig, des Epiphysenknorpels schwächer rot tingiert. In der Höhe des Säulenknorpels beginnt eine dünne subperichondrale intensiv gefärbte Schicht Interzellularsubstanz, die bis zur Diaphyse herabreicht. Das Cytoplasma der Zellen des hyalinen Epiphysenknorpels ist nur in einigen Fällen, das der Zellen des Säulenknorpels erheblich häufiger kräftig rot gefärbt. Weiterhin nehmen nur die Zellkörper der subperichondral gelagerten hypertrophen Knorpelzellen die Rotfärbung an.

b) *Rinderfeten über 100 mm SSL*. In Erweiterung früherer Angaben (KNESE 1959) werden den Befunden an Rinderfeten unter 100 mm SSL diejenigen an größeren zwischen 100 und 150 mm SSL gegenübergestellt. Nach Färbung mit alkoholischer Toluidinblaulösung erscheint das Perichondrium wie bei Feten unter 100 mm SSL orthochromatisch, die Interzellularsubstanz des Knorpels verschieden stark metachromatisch.

Mit gepufferter wäßriger *Toluidinblaulösung* sind bei einem p_H von 2,6 und 3,2 in den Zellen des hyalinen Epiphysenknorpels auch von Rinderfeten bis etwa 130 mm SSL metachromatische Granula nachzuweisen (Abb. 6). Diese Granula verschwinden nach Hydrolysierung mit Hyaluronidase und Diastase völlig, nach Einwirkung von Ribonuclease gleichfalls mit Ausnahme einzelner Granula in Zellen des Proliferations- und Säulenknorpels. Aber auch nach Behandlung mit Desoxyribonuclease werden diese Zelleinschlüsse unsichtbar. In der Appositionszone ist die Interzellularsubstanz ungefärbt, im Zentrum der Epiphyse und zum hypertrophen Knorpel hin nimmt die Färbung an Stärke zu. Die metachromatische Reaktion der Interzellularsubstanz fehlt nach Behandlung mit Hyaluronidase. Nach Einwirkung von Diastase und Desoxyribonuclease bleibt die Metachromasie im hypertrophen Knorpel erhalten; sie ist nach Ribonuclease sogar noch verstärkt. Bei Rinderfeten über 130 mm SSL reagiert die Interzellularsubstanz bereits bei niedrigerem p_H metachromatisch. Granula in den Chondrocyten wurden nicht beobachtet, indessen eine diffuse Metachromasie des Cytoplasma.

Die Metachromasie der Interzellularsubstanz ist nach Färbung mit Toluidinblau in einem p_H von 3,6 verstärkt und hat sich in Richtung des Gelenk- und Appositionsknorpels ausgedehnt. Die metachromatischen Granula der Zellen verschwinden nur nach Hyaluronidase und Desoxyribonucleaseeinwirkung, aber nicht nach Ribonucleasebehandlung.

Die Anfärbbarkeit des Perichondriums mit Toluidinblau in einem p_H von 4,1 ist sehr wechselnd. Im Bereich der Verbindung mit faserigen Gebilden, Bändern und der Gelenkkapsel, ist eine Metachromasie der Zelleiber zu beobachten. Diese Metachromasie ist nach Behandlung mit Hyaluronidase abgeschwächt, nach Einwirkung von Ribonuclease unverändert, abgeblaßt oder gar verstärkt und nach Einwirkung von Desoxyribonuclease stärker. Unterhalb des metachromatisch gefärbten Perichondriums ist die Interzellularsubstanz des Knorpels ungefärbt. Im übrigen reagieren die gelenknahen Teile des Perichondrium teils metachromatisch, teils orthochromatisch. Zur Diaphysenmitte hin, im Bereich der Ausbildung des Periostes, sind entweder alle Zelleiber metachromatisch oder nur jene der Zellen in der Fibroelastika.

Auch mit Toluidinblau bei einem p_H von 4,1 sind metachromatische Granula in allen Knorpelzellen nachzuweisen, ferner beobachtet man eine Färbung des ganzen Zelleibes der hypertrophen Knorpelzellen. Die Granula verschwinden nach Hydrolyse mit Hyaluronidase und Desoxyribonuclease, bleiben aber nach

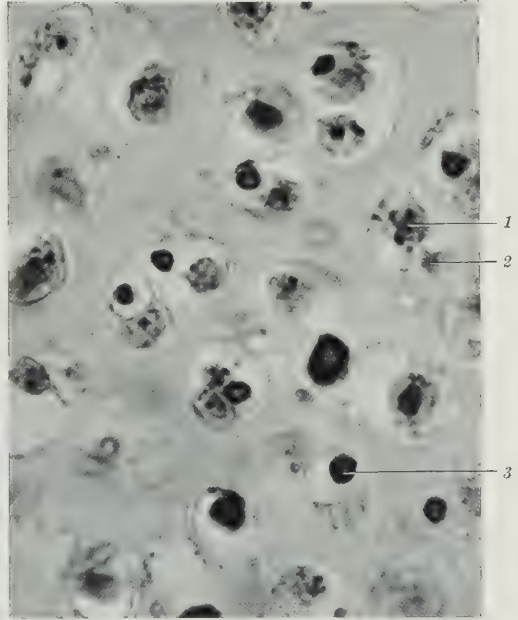


Abb. 6. Hyaliner Epiphysenknorpel. 1 Zellkern mit Nucleolus; 2 Cytoplasma (geschrumpft); 3 metachromatische Granula verschiedener Größe. Metacarpus eines Rinderfeten von 126 mm SSL. Toluidinblau, wäßrige Lösung p_H 3,6. Vergr.: 1240

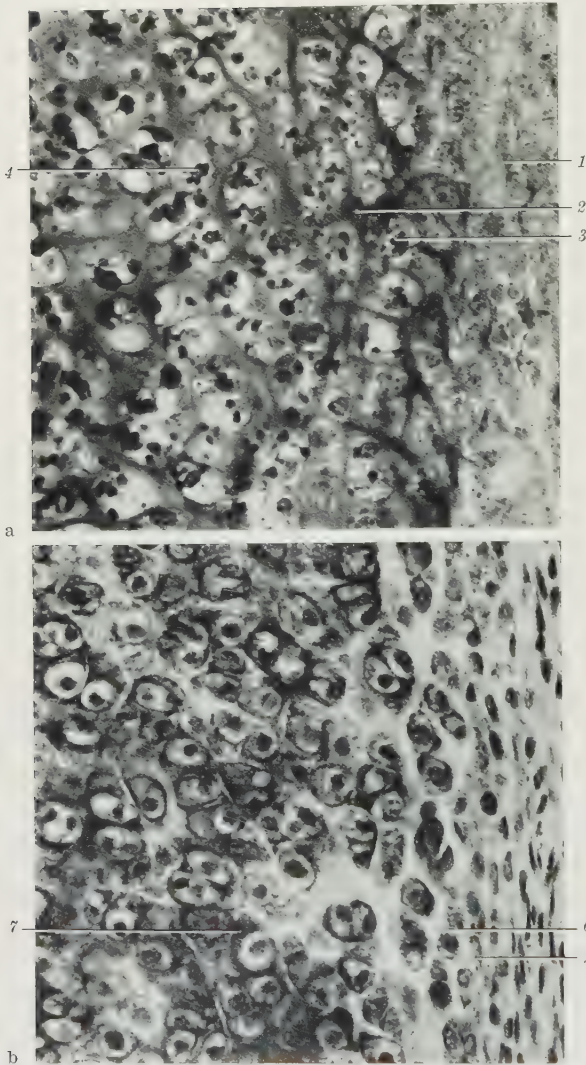


Abb. 7 a u. b. Perichondrium und Knorpel. a Färbung mit HALEs kolloidaler Eisenlösung; b Polysaccharid-Eisenreaktion nach GRAUMANN. a 1 Perichondrium; 2 Interzellularsubstanz des Appositionsknorpels, tief dunkelblau; 3 Chondrocyten des Appositionsknorpels mit kleinen blauen Granula; 4 Zellen des hyalinen Epiphysenknorpels mit verschieden großen Granula; b 5 Perichondrium, zentrale Chondroblasten mit geringer Cytoplasmafärbung; 6 Appositionsknorpel, Interzellularsubstanz fast farblos, schmale Knorpelkapseln; 7 hyaliner Epiphysenknorpel. Färbung der Interzellularsubstanz nimmt mit dem Abstand von den Knorpelkapseln ab. Metacarpus eines Rinderfetens von 126 mm SSL. Vergr.: 480

Ribonucleaseeinwirkung erhalten. Die Metachromasie im Interzellularbereich besteht nach Hyaluronidasebehandlung nur noch im hypertrophen Knorpel. Nach Einwirkung von Ribonuclease ist sie stark herabgesetzt, vor allem im hypertrophen Knorpel.

Mit *Pseudoisocyanin* färbt sich das Perichondrium und die Interzellularsubstanz des Knorpels stark metachromatisch. Am Übergang vom Perichondrium zum Periost bricht die metachromatische Färbung zunächst in den tiefen Schichten, der Kambium-Schicht, dann auch in der Fibroelastika ziemlich scharf ab. Allerdings wurde auch eine Verteilung der Pseudoisocyanin-Metachromasie wie jene nach Färbung mit alkoholischer Toluidinblaulösung beobachtet. Durch Hydrolyse mit Hyaluronidase wird die metachromatische Reaktion der hyalinen Interzellularsubstanz und des Perichondrium herabgesetzt, die der Zellkörper der Knorpelzellen verstärkt. Eine Blockierung mit H_2SO_4 läßt die gesamte Metachromasie verschwinden. Nach einer Vorbehandlung mit HCl ($5\frac{1}{2}$ bzw. 26 Std) färbt sich der Appositionsknorpel orthochromatisch. Nach 48stündiger HCl-Einwirkung ist die Metachromasie der Interzellularsubstanz praktisch geschwunden, diejenige der Zellen des Proliferations- und hypertrophen Knorpels herabgesetzt. Nur die Zellen des Säulenknorpels reagieren noch stark metachromatisch.

Bei Färbung mit *kolloidaler Eisenlösung* nach HALE (CASSELMAN 1959) zeigen die Zellen des Perichondriums mitunter eine schwache Blaufärbung. Die Interzellularsubstanz des Knorpels ist dunkelblau-schwarz tingiert (Abb. 7a). Bereits

die neu eingebauten Chondrocyten weisen mehrere hellblau gefärbte Granula von $0,8-1,5\mu$ Durchmesser auf. Die Granula der Chondrocyten des hyper-

trophen Knorpels entsprechen in der Größe mit $1,0\text{--}3,0\mu$ denen, die sich mit Toluidinblau sichtbar machen lassen. Solche Granula fehlen den Zellen des Säulenknorpels in Nachbarschaft des Proliferationsknorpels. In den Zellen des Säulenknorpels, die unmittelbar in der Zone des Übergangs zum hypertrophen Knorpel liegen, erscheinen wiederum hellblaue Granula; sie nehmen eine oder beide Polregionen der flachen Zellen ein, während sich der Kern in der Mitte der Zelle befindet. Die hypertrophen Knorpelzellen weisen eine zartblaue homogene Färbung des ganzen Zelleibes auf.

Bei der *Polysaccharid-Eisen-Reaktion* nach GRAUMANN (1958) färben sich die Zelleiber der zentralen Chondroblasten zartblau an (Abb. 7b). Jede Zelle ist von einem hellen Hof umgeben. In dem Appositionsknorpel heben sich die dunkel gefärbten Knorpelkapseln von dem etwas helleren Cytoplasma ab. Gleichzeitig tritt um den Kern der jungen Knorpelzellen ein heller ungefärbter Hof auf. Die Chondrocyten sind in zartblau gefärbte hyaline Interzellularsubstanz eingebettet, während sie im Säulenknorpel fast ungefärbt ist. Die hypertrophen Knorpelzellen zeigen als einzige Chondrocyten ein dunkelblau gefärbtes Cytoplasma.

Mit der von MÜLLER (1955/56) modifizierten Hale-Färbung stellt sich die Interzellularsubstanz des Knorpels tief dunkelblau dar, während das umgebende Gewebe im allgemeinen schwach blaugefärbt ist. Eine allgemeine Aufhellung der Färbung tritt nach Hyaluronidasebehandlung ein, ebenso nach Vorbehandlung mit Ribonuclease und Desoxyribonuclease; allerdings bleiben die Längsbalken im Säulenknorpel nach Behandlung mit Desoxyribonuclease fast ungefärbt. Nach Einwirken beider Fermente auf das gleiche Präparat färbt sich das Cytoplasma der hypertrophen Knorpelzellen tief dunkelblau, während es heller gefärbt ist, wenn keine Enzymbehandlung vorgenommen wurde. Eine schwache Anfärbung der Längsbalken tritt auch nach Pepsin-Digestion auf. Hierbei bleiben die peripheren Schichten der Interzellularsubstanz dunkler als die tiefen. Eine Veränderung der Zellfärbbarkeit war bei Pepsinanwendung nicht zu beobachten.

Blockierung der basischen Proteine durch Ninhydrin nach GEYER (1959) vor der Eisenfärbung ergibt in den tiefen Schichten eine Blaufärbung des Perichondrium, die wahrscheinlich das Cytoplasma der Chondroblasten betrifft. Im Knorpel erhält man ein ähnliches Färbungsbild wie mit der Methode von GRAUMANN; das Cytoplasma der hypertrophen Knorpelzellen erscheint tief dunkelblau.

Bei Färbung mit gepufferter *Methylenblaulösung* tritt bei einem p_H von 2,6 eine sehr schwache, nur bei Anwendung eines Blaufilters sicher erkennbare Metachromasie der Interzellularsubstanz des Säulenknorpels auf. Die metachromatische Färbung dehnt sich bei einem p_H von 3,6 in einem kräftigeren Ton auf die Interzellularsubstanz des hypertrophen Knorpels aus. Der Appositions- und Gelenkknorpel bleibt ungefärbt. Die gelenknahen Teile des hyalinen Epiphysenknorpels und jene, die dem Säulenknorpel benachbart sind, reagieren dagegen metachromatisch. Zwischen beiden Gebieten liegt eine Schicht mit schwacher Metachromasie der Interzellularsubstanz. Bei den weiteren p_H -Stufen bis 5,3 nimmt der Ton der Färbung zu, die Verteilung und die Differenzierung der einzelnen Abschnitte bleibt unverändert. Vereinzelt stellt sich auch die Appositionszone metachromatisch dar.

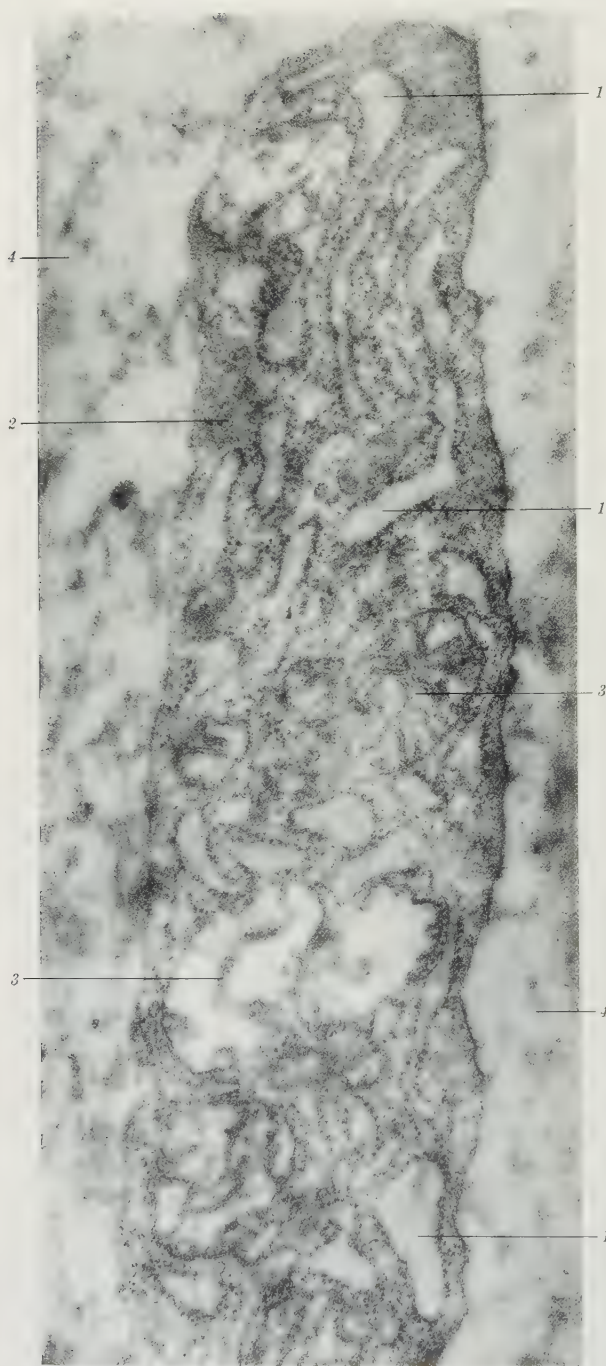


Abb. 8. Junger Chondrocyt aus der Appositionszone. 1 Teilweise erweiterte Zisternen; 2 Hyaloplasma mit dichter Lagerung von Palade-Granula; 3 Mitochondrien zum Teil mit Cristae mitochondriales; 4 hyaline Interzellularsubstanz.

Vergr.: 73 000

Nach Hyaluronidase-Einwirkung vor der Methylenblaufärbung verschwindet beim pH 4,1 die Metachromasie der Interzellularsubstanz völlig. Nur im Säulenknorpel ist sie, wenn auch abgeschwächt, noch vorhanden. Ribonucleasebehandlung bewirkt eine Abschwächung der metachromatischen Anfärbung, sehr stark im Appositions- und Gelenknorpel, etwas schwächer im Proliferationsknorpel. Nach Behandlung desselben Präparates mit beiden Enzymen sind nur noch die Kerne orthochromatisch tingiert. Die Desoxyribonuclease-Digestion schwächt die Metachromasie etwas ab, stärker im Appositionsgebiet, allerdings in schmälerer Zone als bei Verwendung von Ribonuclease. Die Einwirkung von Pepsin setzt die metachromatische Anfärbung gering, die von Diastase stärker herab, wiederum mit Ausnahme des Säulenknorpels. Bei Färbung mit Methylenblau eines pH über oder unter 4,1 ergeben sich nach enzymatischer Vorbehandlung gleichartige Verhältnisse.

Das Cytoplasma der Chondroblasten bleibt bei Färbung mit Methylenblau in einem pH von 3,6—4,1 im allgemeinen ungefärbt. Der Übergang vom Perichondrium zum Periost, von den Chondroblasten zu den Osteoblasten, ist infolge der starken Basophilie der Osteoblasten im allgemeinen gut zu erkennen. Vereinzelt kann auch eine Metachromasie

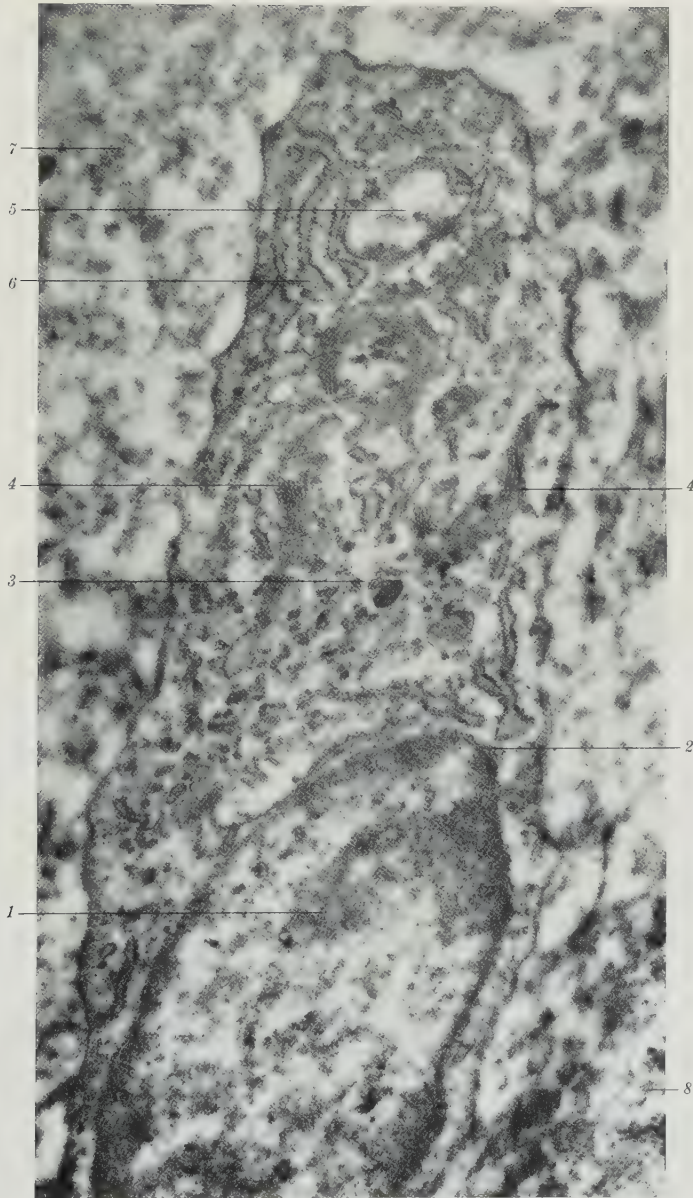


Abb. 9. Junger Chondrocyt aus der Appositionszone. 1 Zellkern; 2 Kernmembran; 3 Golgi-Feld mit dunkeln Körpern; 4 Golgi-Lamellen; 5 Mitochondrien; 6 gering erweiterte Zisternen; 7 Interzellularsubstanz mit überwiegend längsgeschnittenen Fibrillen; 8 Interzellularsubstanz mit Faserquerschnitten.
Vergr.: 52 000

des Cytoplasmas der Bildungszellen und der gering entwickelten Interzellularsubstanz des Perichondrium auftreten, vor allem an Orten der Einstrahlung größerer Fasermassen. In Diaphysenrichtung erscheint die Interzellularsubstanz der Appositionszone als feines, blauschwarz gefärbtes Band abgesetzt. Nach Hyaluronidasebehandlung tritt diese oberflächliche Interzellularsubstanz klarer



Abb. 10. Chondrocyten am Übergang vom Säulenknorpel zum hypertrophen Knorpel. 1 Osteoblast; 2 präossales Gewebe; 3 im Schnitt dreieckige Knorpelzelle mit dichtem Cytoplasma und blasenartiger Erweiterung einer Zisterne; 4 Zellen des Säulenknorpels mit einer Reihe von Zisternerweiterungen sowie von der Kapsel abgerissenen Zellfüßen; 5 hypertrophe Knorpelzelle mit einzelnen Ergastoplasma-membranen; 6 Kern mit Nukleolus dieser Zelle; 7 Schrumpfraum; 8 Interzellulärsubstanz. Vergr.: 4700

hervor, das Cytoplasma der Chondroblasten weist eine geringe orthochromatische Anfärbung auf. Nach Ribonucleaseeinwirkung sind die Chondroblasten ungefärbt, die beschriebene Blautönung der oberflächlichen Interzellulärsubstanz ist abgeschwächt. Die Färbung mit Methylenblau und vorangegangener Hydrolyse mit beiden Fermenten am gleichen Präparat, d. h. Hyaluronidase und Ribonuclease, ergibt nur noch eine reine Kernfärbung.

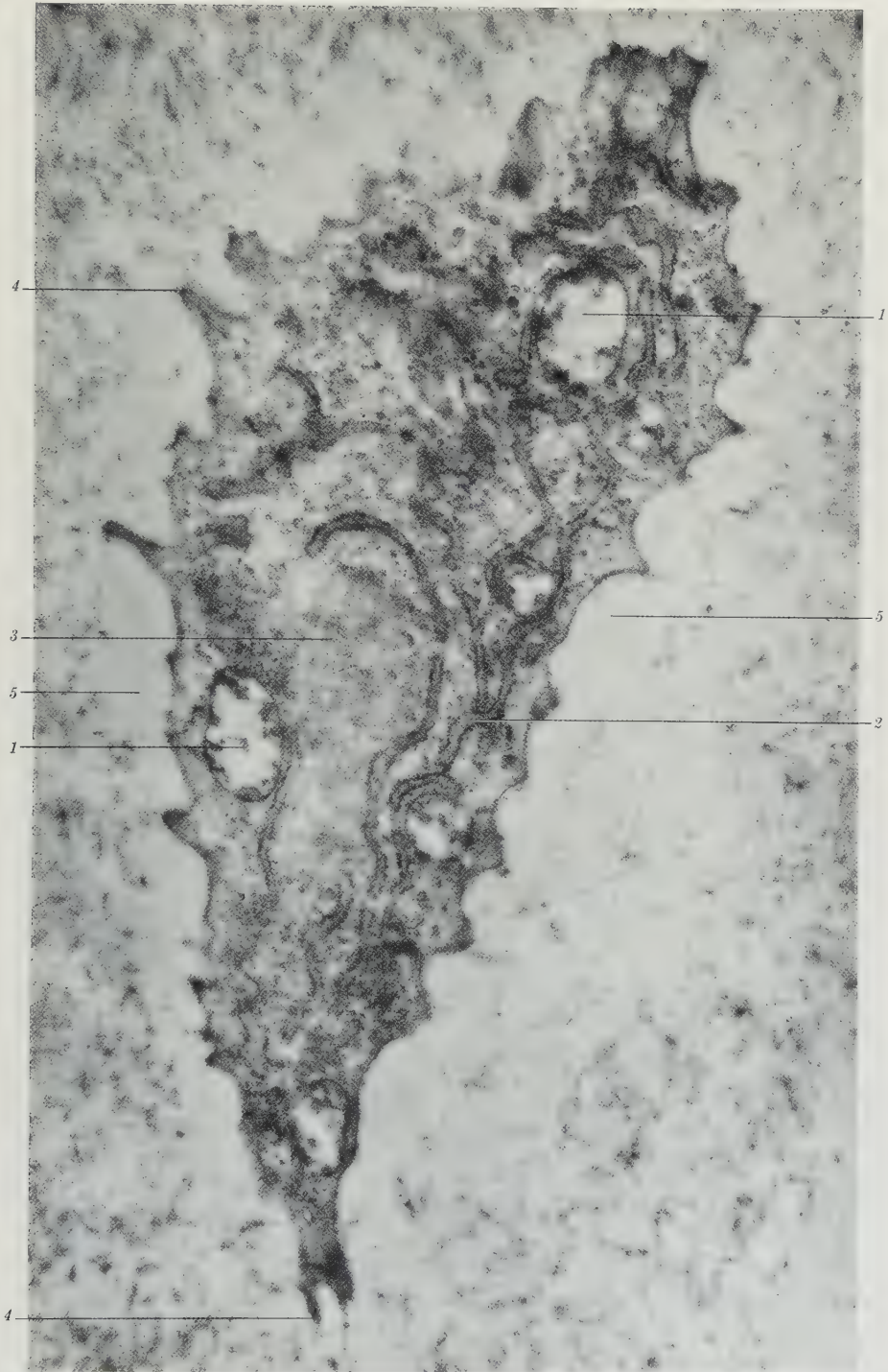


Abb. 11. Junger, im Schnitt dreieckig erscheinender Chondrocyt am Übergang von der Appositionszone zum hyalinen Epiphysenknorpel. 1 Mitochondrien; 2 endoplasmatisches Retikulum mit geringer Erweiterung des intermembranösen Spaltes; 3 homogene Cytoplasmazone; 4 Zellfüße in Kontakt mit der Interzellularsubstanz; 5 Schrumpfraum. Vergr.: 23 000

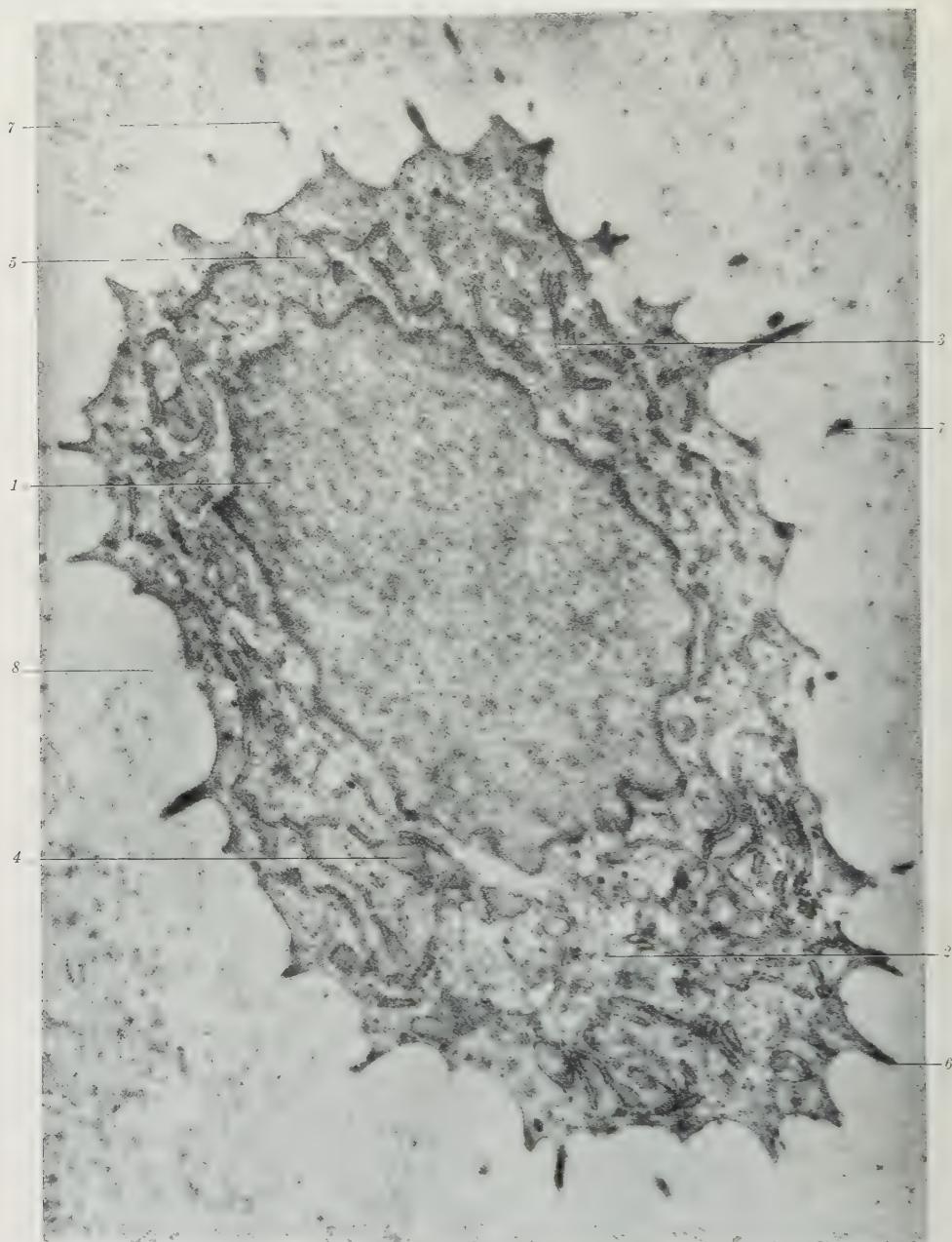


Abb. 12. Chondrocyt des hyalinen Epiphysenknorpels. 1 Zellkern; 2 Golgi-Feld; 3 endoplasmatisches Retikulum mit annähernd gleicher Breite der Zisternen; 4 gering erweiterte Zisternen; 5 Mitochondrien; 6 Zellfüße in Kontakt mit der Interzellulärsubstanz; 7 angeschnittene Zellfüße; 8 Schrumpfraum.
Vergr.: 17 000

Bei Galloeyaninfärbung bleibt das Cytoplasma der Chondroblasten farblos, während die Zelleiber der Osteoblasten am Ende der Diaphysenröhre einen Grauton annehmen.

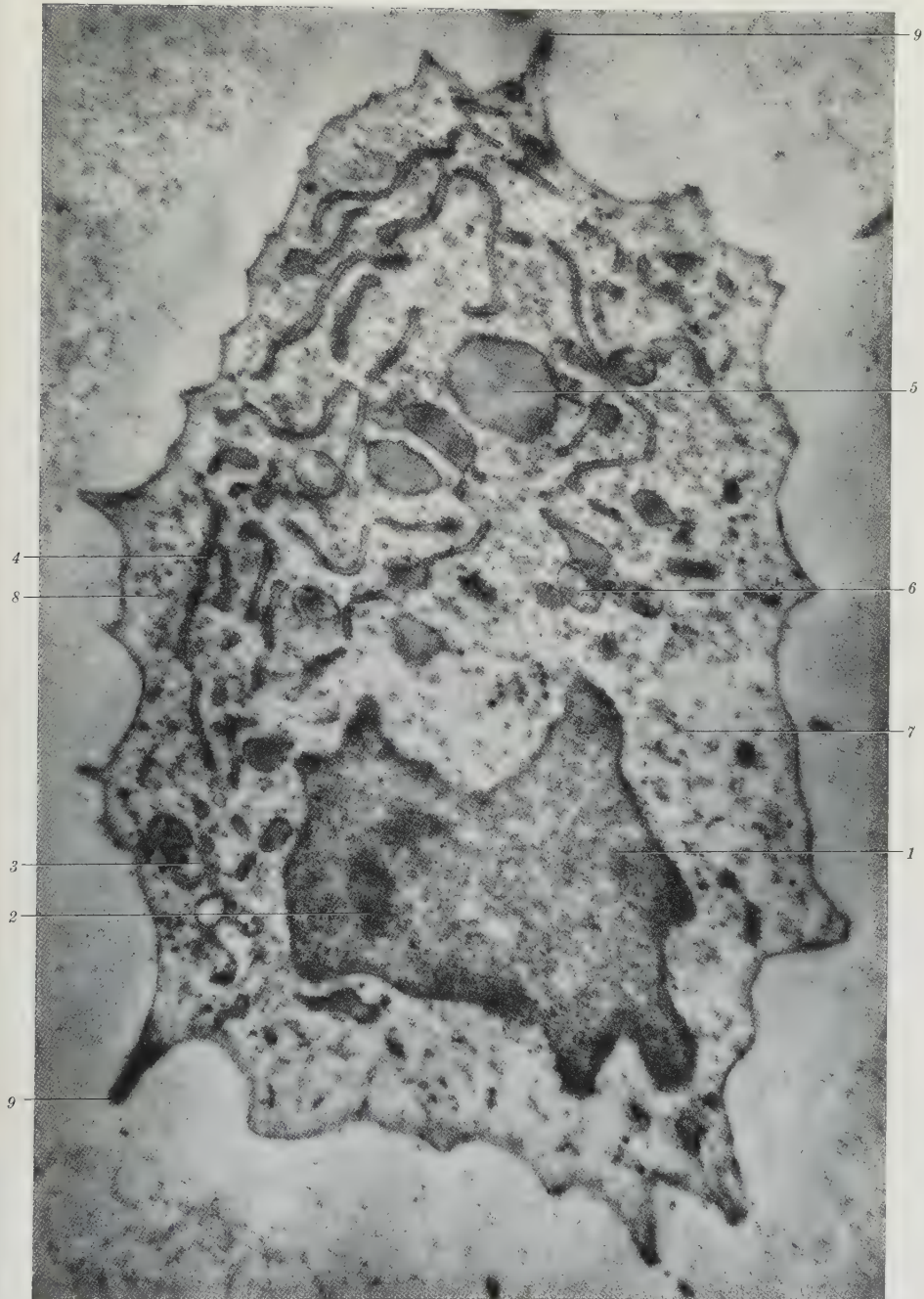


Abb. 13. Chondrocyt des hyalinen Epiphysenknorpels. 1 Zellkern; 2 Nukleolus; 3 Golgi-Lamellen; 4 endoplasmatisches Retikulum mit annähernd gleichbreiten Zisternen; 5 sackartig erweiterte Zisternen; 6 Mitochondrien; 7 Hyaloplasmabezirke mit geringer Substanzdichte; 8 Hyaloplasma mit Palade-Granula; 9 Zellfüße in Kontakt mit der Interzellulärsubstanz. Vergr.: 16 500

Die Anfärbbarkeit der Knorpelzellen mit Methylenblau und die Verteilung des PAS-positiven Materials entspricht jener, die man bei Feten unter 100mm SSL beobachtet.

3. Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Zellen des Epiphysenknorpels

Jenseits der Knorpelbildungsfront, d. h. nach Bildung der hyalinen Interzellularsubstanz, liegen im *Appositionsknorpel* lange schmale Zellen mit ihrer Längsachse parallel zur Oberfläche des Skeletstückes (Abb. 8). Das elektronenmikroskopisch recht dichte Hyaloplasma dieser jungen Chondrocyten enthält

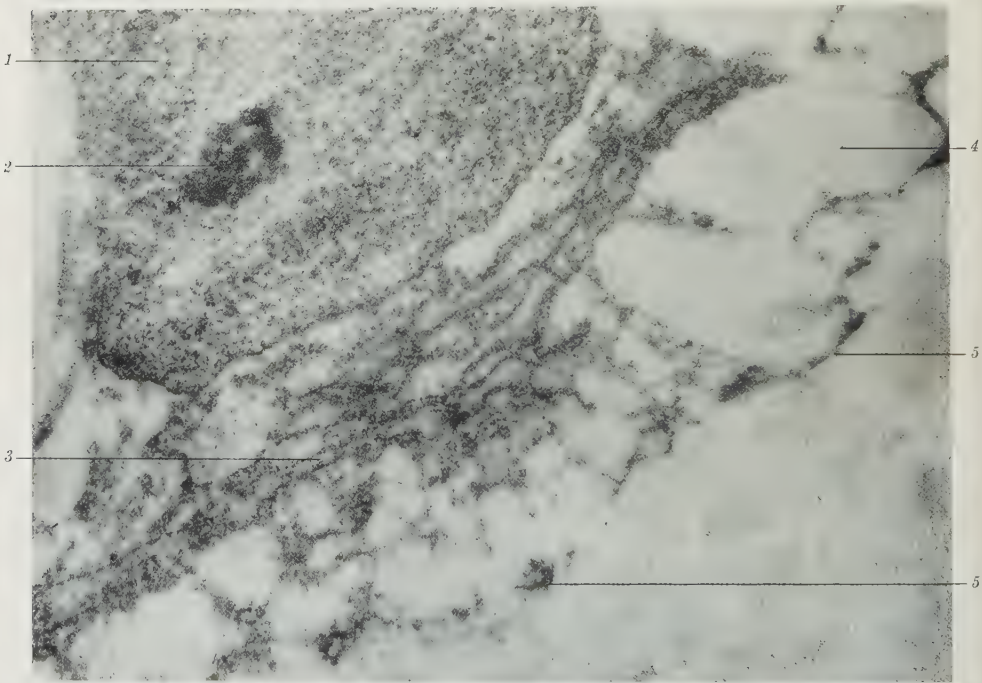


Abb. 14. Teil eines mit Formalin fixierten Chondrocyten. 1 Zellkern; 2 Nukleolus; 3 endoplasmatisches Retikulum; 4 Vakuolen; 5 Verbindung der Zelle mit der Interzellularsubstanz. Vergr.: 22 500

verstreut liegende Palade-Granula und ein endoplasmatisches Retikulum mit Zisternen von annähernd gleicher Breite. Nur vereinzelt erscheinen sackartige Erweiterungen der Zisternen. Die Zellen enthalten Mitochondrien und häufig ein gut ausgebildetes Golgifeld mit größeren dunkleren Körpern, Bläschen und Lamellen (Abb. 9).

Die *Metamorphose der jungen Knorpelzellen* in Zellen des hyalinen Epiphysenknorpels von annähernd elliptoider oder rundlicher Gestalt ist mit einer Vergrößerung des Zelleibes verbunden, die fast ausschließlich auf Kosten des Hyaloplasmas erfolgt. Die Formänderung der Zellen beginnt mit der Ausbildung einer kantigen, im Schnitt vielfach dreieckigen Zellgestalt (Abb. 10). Eine Fläche der Zelle liegt weiterhin der Oberfläche des Skeletstückes parallel, die gelenknahe

quer und die markwärts gerichtete schräg. Form und Menge des endoplasmatischen Retikulums scheinen sich nicht zu ändern (Abb. 11), doch nimmt das Hyaloplasma an Volumen zu. Die Zellen im Bereich des Übergangs der Appositionszone zu der der hyalinen Epiphysenknorpels runden sich zu ovoiden Gebilden ab,

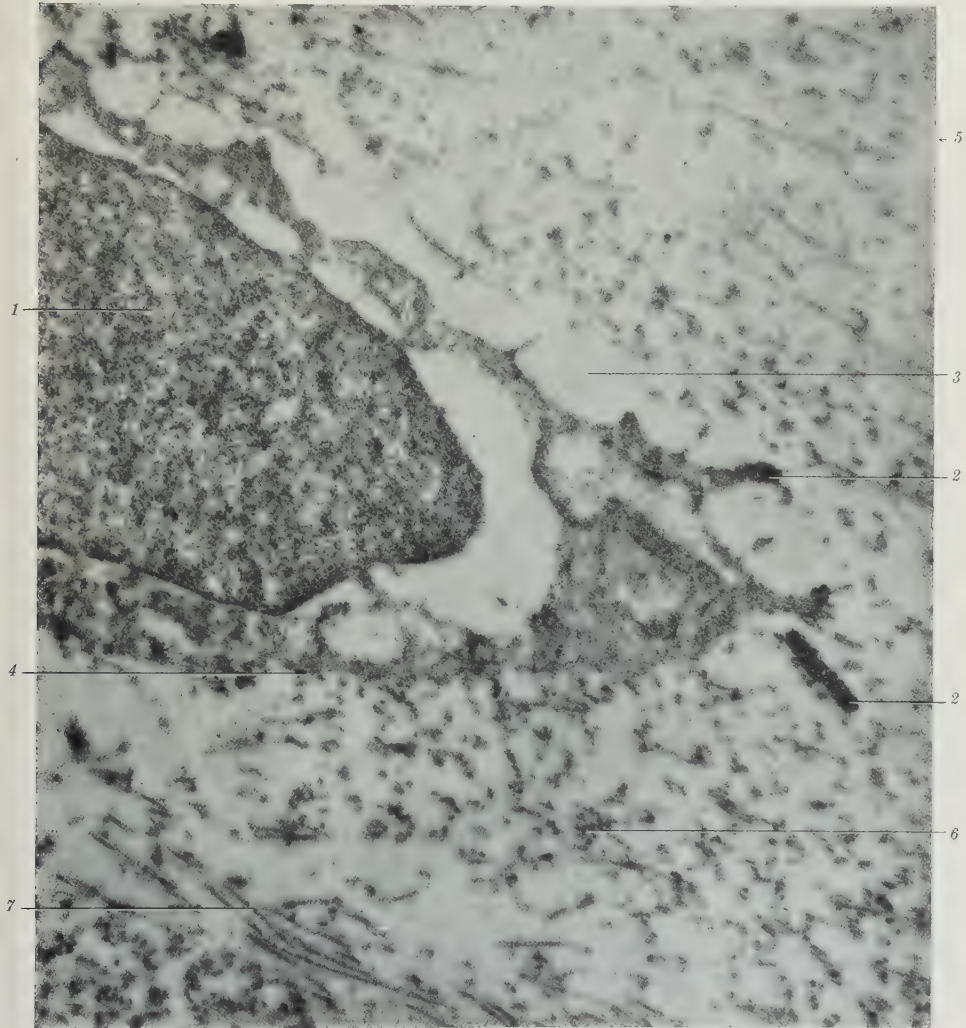


Abb. 15. Teil einer jungen mit Formalin fixierten Knorpelzelle. 1 Zellkern; 2 Zellfüße in Kontakt mit der Interzellularsubstanz; 3 kleinere Schrumpfräume; 4 unmittelbarer Kontakt zwischen Zelle und Interzellularsubstanz, Fibrillenquerschnitte liegen der Zelle an; 5 fibrillenarme Interzellularsubstanz; 6 Quer- und Schrägschnitte von Fibrillen der Interzellularsubstanz; 7 Längsschnitte kollagener Fibrillen mit deutlicher Querstreifung. Vergr.: 29000

während sie sich im Gebiet des Übergangs zum Säulenknorpel abflachen. Sehr bald treten in den Chondrocyten einzelne sackartig erweiterte Zisternen auf (Abb. 12), deren Oberfläche regelmäßig Mitochondrien dicht benachbart sind. Derartige Säcke können zu erheblicher Größe (Durchmesser 10000–29000 Å) anschwellen, während die Zisternen im restlichen endoplasmatischen Retikulum

ihre ursprüngliche Weite beibehalten (Abb. 13). Im Zelleib einiger Chondrocyten liegen größere feingranuläre bzw. annähernd homogene Bezirke, die gegen das Cytoplasma nicht abgegrenzt sind (Abb. 11).

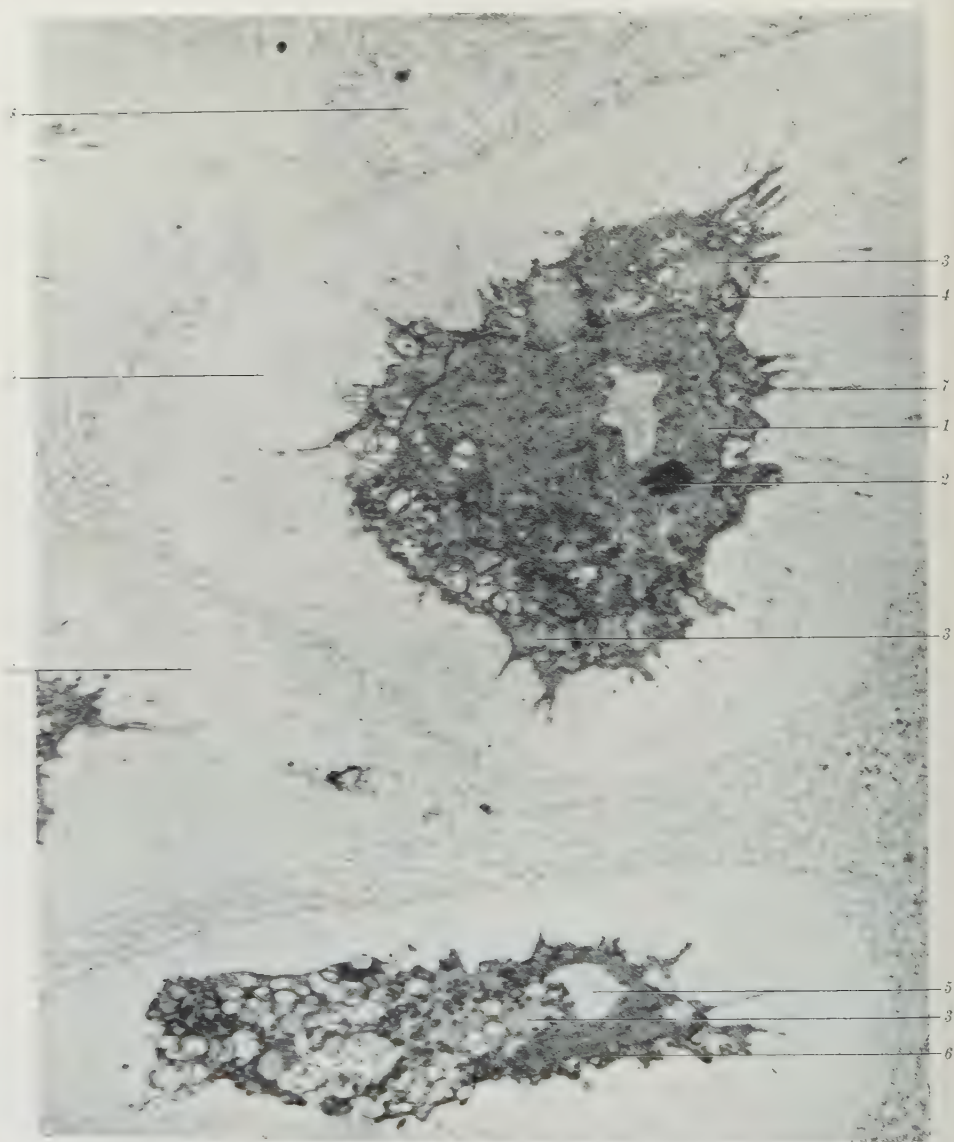


Abb. 10. Chondrocyt in der Zone von Proliferations- zum Säulenknorpel. 1 Zellkern; 2 Nukleolus; 3 Zellkörper mit feingranulärem Inhalt; 4 Mitochondrien; 5 Vakuolen; 6 Hyaloplasma; 7 Zellfüße mit Sarkomerfibrillen; 8 Interzellulärschub; 9 Schrumpfraum. Vergr.: 10 000

Die Beziehungen der Knorpelzellen zur Interzellulärschub konnten wir durch Untersuchung von mit *Formalin* fixiertem Material aufklären. Bereits an den mit *Osmium* fixierten Knorpelzellen fällt auf, daß einzelne schmale

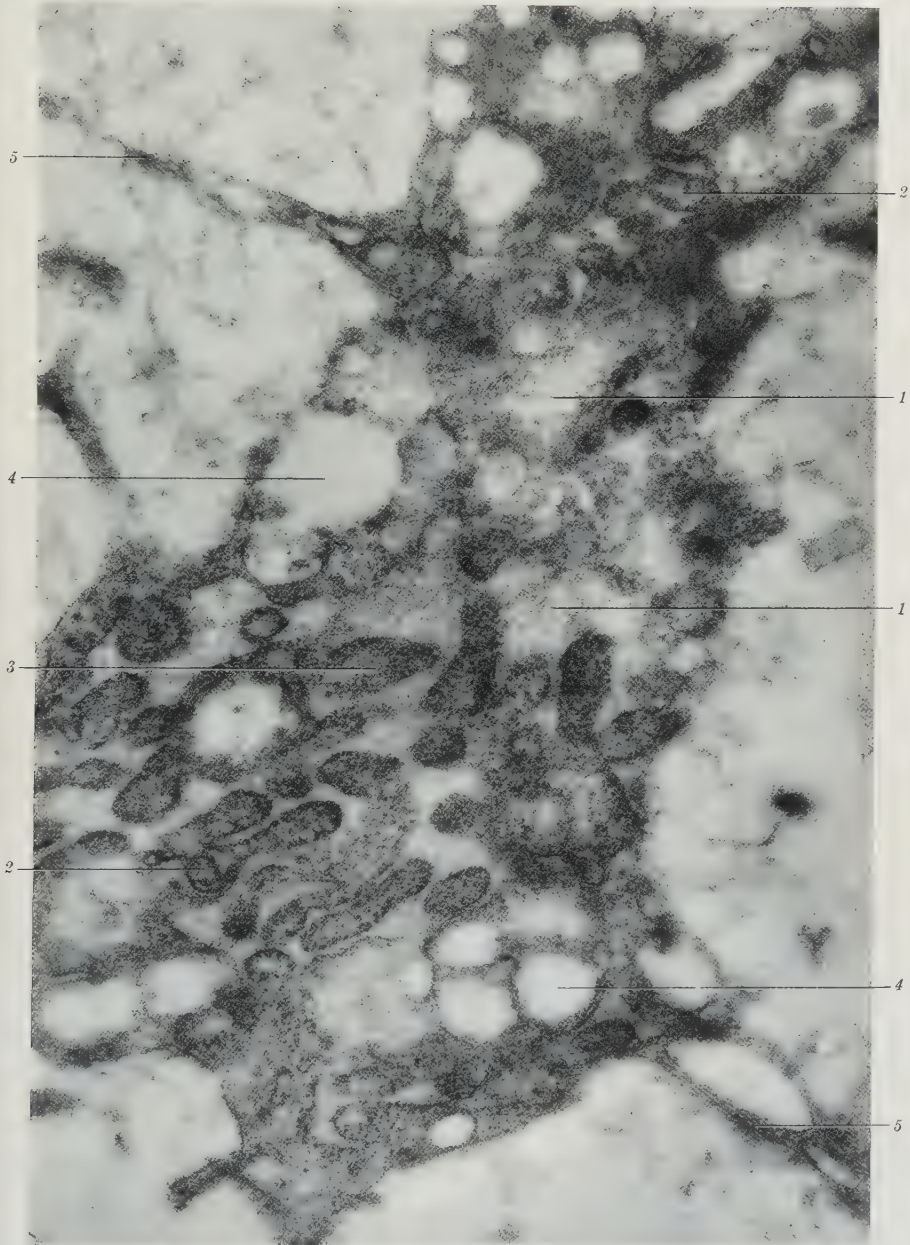


Abb. 17. Ausschnitt aus einem Chondrocyten am Übergang vom Proliferations- zum Säulenknorpel. 1 Stark erweiterte und miteinander kommunizierende Zisternen; 2 kleinere hyaloplasmatische Bezirke mit Palade-Granula, z. T. tangential angeschnittenen Membranen des endoplasmatischen Retikulum; 3 Mitochondrien; 4 Vakuolen; 5 Zellfüße. Vergr.: 45 000

Fortsätze bis an die Interzellulärsubstanz, die Kapsel, dicht heranreichen. Zwischen diesen Fortsätzen liegen Einbuchtungen der Zelloberfläche, die offensichtlich durch Schrumpfung entstanden sind. Diese Annahme kann an dem mit

Formalin fixierten Material bestätigt werden (Abb. 14). Von einem perinukleären Cytoplasmahof aus erreichen Cytoplasmabrücken eine Schicht, die der Interzellularsubstanz eng anliegt. Einzelne größere Bezirke des Zelleibes enthalten eine homogene wolkige Substanz. Dagegen treten elektronenmikroskopisch leere

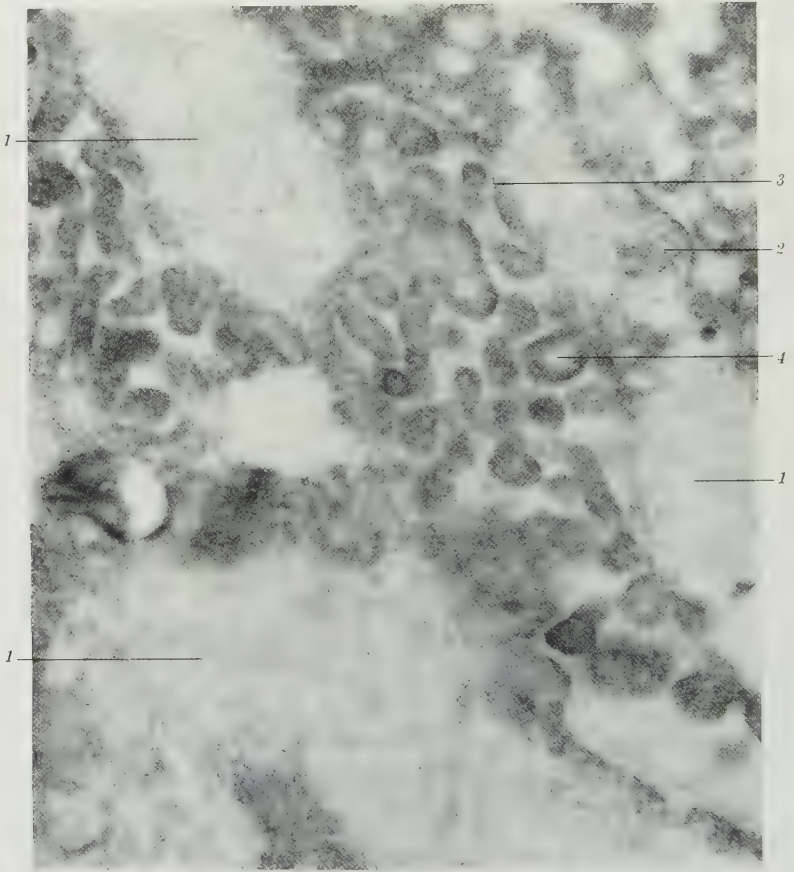


Abb. 18. Ausschnitt aus einer Knorpelzelle am Übergang vom Proliferations- zum Säulenknorpel. 1 Stark erweiterte Zisternensäcke; 2 tangential geschnittene umhüllende Membranen des endoplasmatischen Retikulum; 3 annähernd senkrecht geschnittene umhüllende Membranen des endoplasmatischen Retikulum; 4 kleine hyaloplasmatische Bezirke. Vergr.: 40 000

Zellbezirke auf. Das Zellbild ist nunmehr dem bei der PAS- bzw. Toluidinblau-Färbung zu beobachtenden sehr ähnlich.

Jungen Knorpelzellen kann sich die Interzellularsubstanz sehr eng anlagern (Abb. 15). Die Kollagenfibrillen liegen den Zellen zum Teil unmittelbar an. An Längsschnitten der Fibrillen ist nach Formalin-Fixierung eine Querstreifung (s. S. 241) deutlich. Bei älteren Knorpelzellen sind nur dünne periphere Cytoplasmaschichten in Kapselnähe nach Formalinfixierung zu beobachten. Mitunter gewinnt man den Eindruck, daß Cytoplasmafortsätze in die Interzellularsubstanz hineinreichen. Solche echten Cytoplasmafortsätze könnten „Haftpunkten“ ent-

sprechen, wie sie nach Osmiumfixierung zu beobachten sind, zwischen denen sich die Zellwand bei der Präparation retrahiert.

Nunmehr ist der *Strukturwandel* der mit Osmium fixierten Chondrocyten im Epiphysenknorpel zu verfolgen. An die Zone des hyalinen Epiphysenknorpels schließt sich die des *Proliferationsknorpels* an. Das Cytoplasma der Zellen im Proliferationsknorpel ist elektronenmikroskopisch sehr dicht (Abb. 16). Der Zelleib ist von zahlreichen Vakuolen erfüllt, die nach Größe, Form und Inhalt

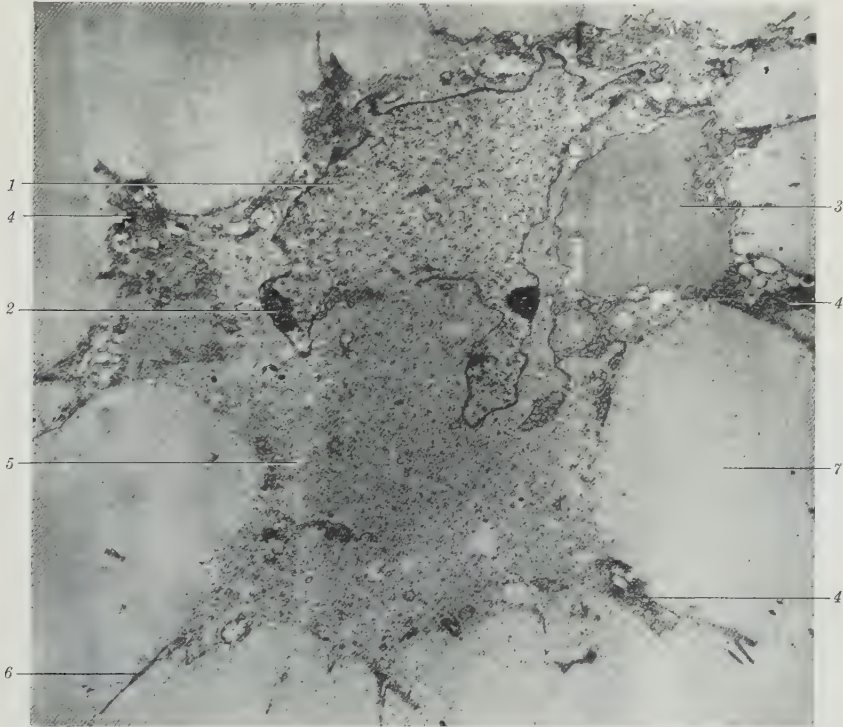


Abb. 19. Chondrocyt in Umwandlung zur hypertrophen Knorpelzelle. 1 Zellkern; 2 Nukleolus; 3 Zisternensäcke; 4 in die Zellperipherie gedrängte Reste des endoplasmatischen Retikulum mit eingeschlossenen dunklen hyaloplasmatischen Bezirken; 5 ursprünglicher Zisterneninhalt, der fast den ganzen Zelleib umfaßt, durch Schrumpfung verdichtet; 6 Zellfüße mit Sekundärfüßchen; 7 Schrumpfraum. Vergr.: 5000

variieren. Neben elektronenmikroskopisch fast leer erscheinenden Vakuolen treten andere sehr unregelmäßig gestaltete lakunäre Räume auf, die eine homogene Substanz enthalten. Kleine rundliche Komplexe von verhältnismäßig dichter Struktur entpuppen sich als Ausschnitte des Grundplasma, das von zahlreichen Palade-Granula durchsetzt ist. Zum Teil ist die Wand dieser hyaloplasmatischen Bezirke tangential getroffen (Abb. 17). Der Schnitt kann dann durch die Membran, viel häufiger aber durch die Schicht der Palade-Granula führen.

Die größeren mit einer hellgrauen, wolkig erscheinenden Substanz gefüllten und miteinander verbundenen Räume in Zellen des Proliferationsknorpels sind die extrem erweiterten Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (Abb. 17).

Infolge der Größe dieser Zisternen ist nicht überall klar auszumachen, ob Hyaloplasma und Zisternen voneinander abgegrenzt sind. Der Eindruck, daß an manchen Orten Verbindungen zwischen beiden Cytoplasmaräumen vorliegt, dürfte dadurch hervorgerufen sein, daß die trennenden Membranen und die ihnen angehörenden Körnchen tangential geschnitten sind. Wir neigen zu der Annahme, daß in den Zellen des Proliferations- und Säulenknorpels Grundplasma und Zisternen keine Verbindung miteinander haben. Im übrigen sahen

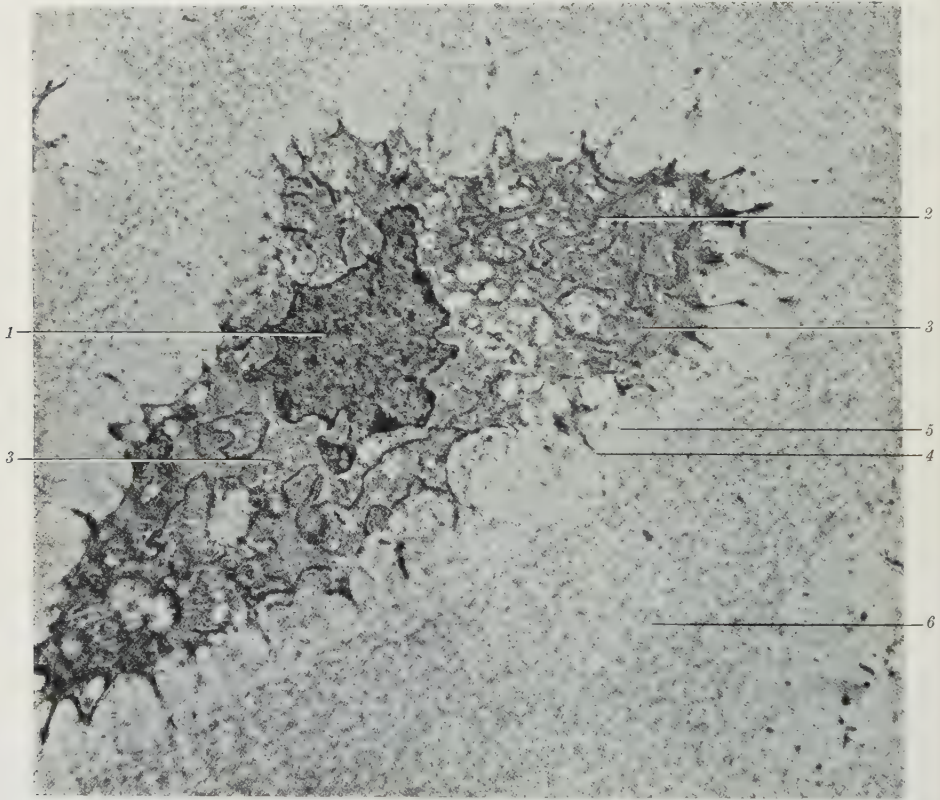


Abb. 20. Chondrocyt in Umwandlung zur hypertrophen Knorpelzelle. 1 Zellkern; 2 Membranen des endoplasmatischen Retikulum; 3 graues granuläres Zytoplasmamaterial (ursprünglicher Zisterneninhalt?); 4 Zelfüße; 5 Schrumpfraum; 6 Interzellulärsubstanz. Verg.: 5000

wir elektronenmikroskopisch in Zellen des Säulenknorpels Vakuolen, die ihrer Größe von $1-1,5\mu$ nach den orthochromatischen Zellabschnitten entsprechen dürften, wie sie bei Färbung mit Toluidinblau auftreten.

Die Umwandlung von Zellen des Säulenknorpels zu solchen des *hypertrophen Knorpels* geht nach unseren Beobachtungen ziemlich plötzlich vor sich, bei benachbarten Zellen aber nicht vollständig synchron. Sie scheint mit einer erheblichen Erweiterung der Zisternen zu beginnen (Abb. 18). Größere Abschnitte des Zelleibes bestehen aus einer dichten, grauen, annähernd homogenen Substanz, in die hyaloplasmatische Einschlüsse und viele Vakuolen eingebettet

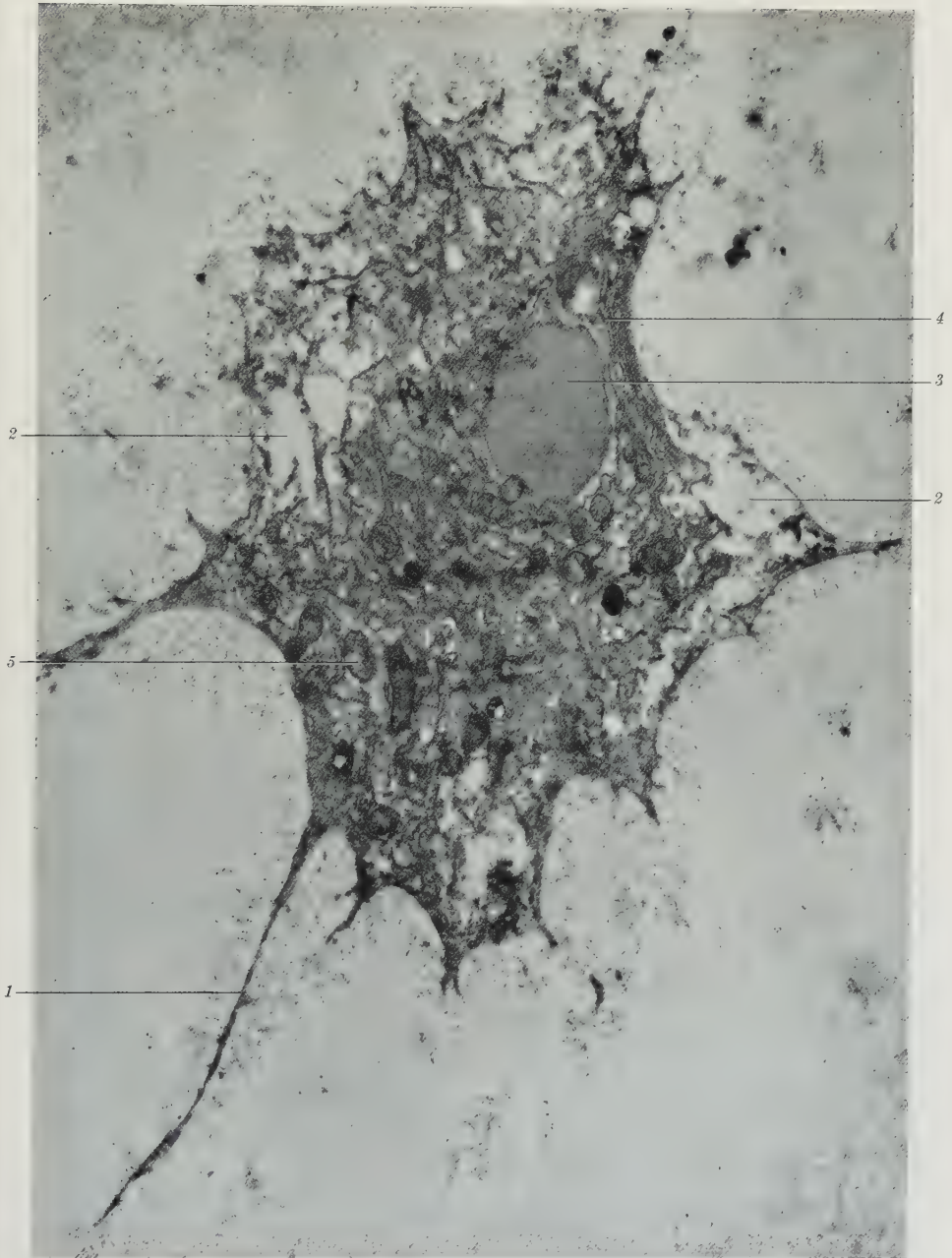
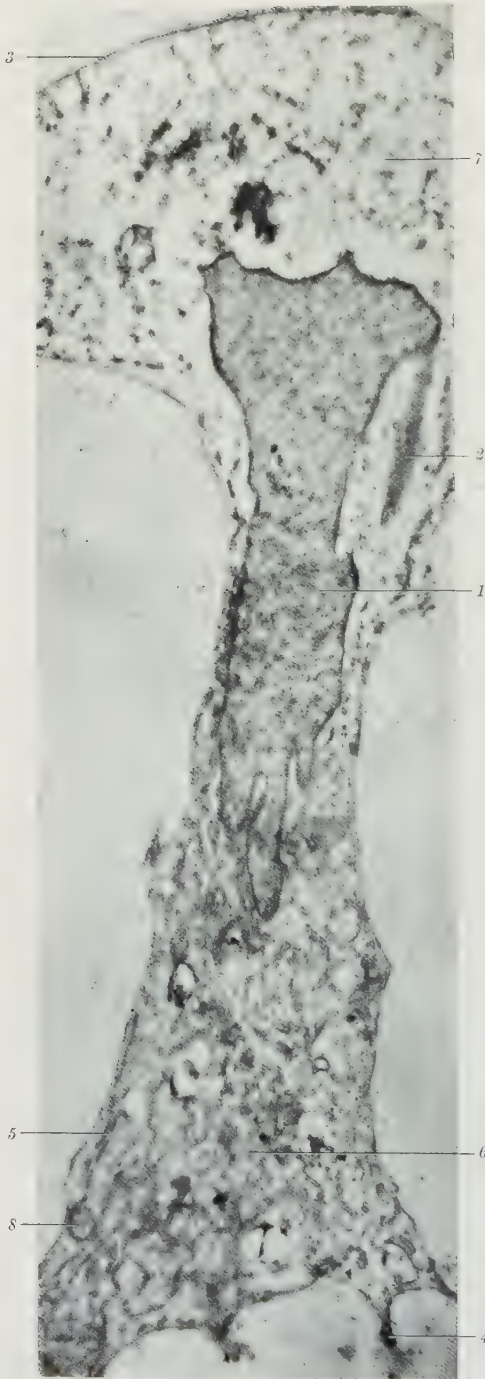


Abb. 21. Stark geschrumpfte Knorpelzelle. 1 Zellfüße besetzt mit Sekundärfüßchen; 2 Randvakuolen durch Schrumpfung verkleinert; 3 sackartige Zisternen; 4 endoplasmatisches Retikulum; 5 Mitochondrien. Vergr.: 8500

sind. In einem nächsten Schritt werden die hyaloplasmatischen Bezirke in die Zellperipherie abgedrängt (Abb. 19). Einzelne größere Zisternensäcke von



18000—48000 Å Durchmesser können in hypertrophen Knorpelzellen erhalten bleiben. Der größte Teil des Zellleibes besteht im übrigen aus einer fast gleichartigen, etwas aufgelockerten, nicht mehr homogenen, sondern mehr granulären Masse. Diese Substanz reicht an die Zellmembran und an den Kern heran. Es ist nicht zu entscheiden, ob der Zisterneninhalt durch die umhüllenden Membranen hindurchgetreten ist oder ob der Zisternenraum die Stelle des ursprünglichen Grundplasmas einnimmt. Der vorliegende elektronenmikroskopische Befund entspricht aber der mit Toluidinblau nachzuweisenden allgemeinen Cytoplasmametachromasie der hypertrophen Knorpelzelle.

Bemerkenswerterweise tritt in diesen Übergangszellen wiederum ein endoplasmatisches Retikulum auf (Abb. 20), dessen intermembranöser Spaltraum gelegentlich geringgradige Erweiterungen aufweist. Der Änderung der Zellstruktur scheint auch eine andere Löslichkeit zu entsprechen. So können durch Schrumpfung Zellen mit langen Fortsätzen entstehen (Abb. 21), deren feinste Sekundärfortsätze offensichtlich aus der Interzellularsubstanz herausgerissen sind. In den peripheren Bezirken der Zelle liegen durch Schrumpfung stark verkleinerte Vakuolen. Einzelne sackartig erweiterte Zisternen sind gleichfalls vorhanden. Die Struktur des Cytoplasmas ist wahrschein-

Abb. 22. Chondrocyt mit Umwandlung eines dichten Cytoplasma in das lockere der hypertrophen Knorpelzelle. 1 Zellkern mit lappenartigen Fortsätzen; 2 tangential geschnittener Kernlappen; 3 Plasmalemm mit feinsten aus der Interzellularsubstanz gerissenen Füßchen; 4 größere Zellfüße; 5 endoplasmatisches Retikulum; 6 Hyaloplasma mit Granula; 7 fast substanzleeres Hyaloplasma; 8 Mitochondrien. Vergr.: 7000

lich ebenfalls durch Schrumpfung dichter geworden. Membranen des endoplasmatischen Retikulums und Mitochondrien sind in eine graue körnige Masse

eingebettet. Die Struktur der vakuolären Zellbereiche erinnert bereits an die der voll ausgebildeten hypertrophen Knorpelzelle. In anderen Zellen besitzt ein Bezirk die Struktur der hypertrophen Knorpelzellen mit elektronenmikro-

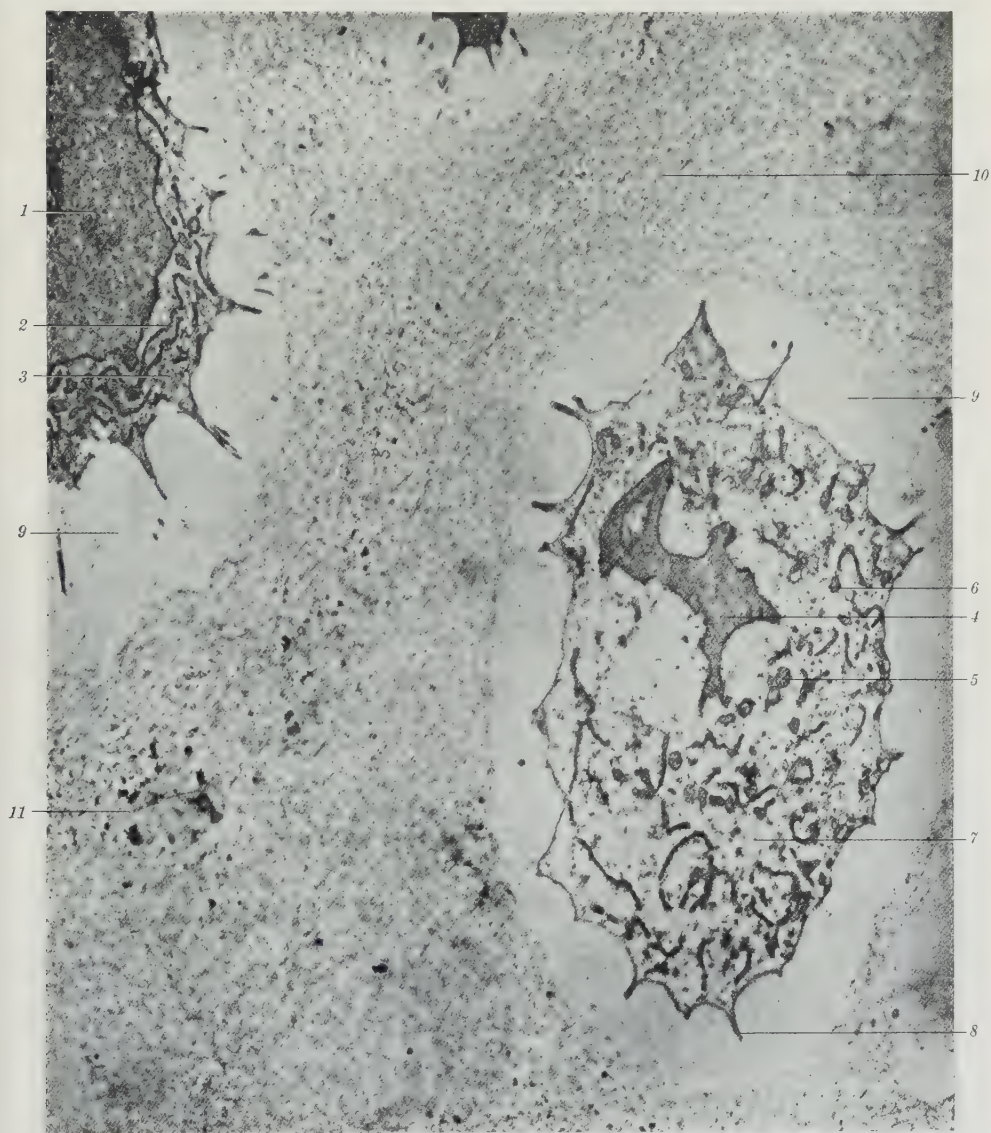


Abb. 23. Hypertrophe Knorpelzelle. 1 Kern einer nur teilweise abgebildeten Zelle; 2 endoplasmatisches Retikulum; 3 relativ dichtes Hyaloplasma; 4 Kern der voll abgebildeten Zelle; 5 Mitochondrien; 6 gering erweiterte Zisternen; 7 locker erscheinendes Hyaloplasma mit einzelnen Granula; 8 Zellfüße; 9 Schrumpfraum; 10 Interzellulärsubstanz; 11 kleines Kalkdepot. Vergr.: 6000

skopisch praktisch leerem Grundplasma und Doppelmembranen (Abb. 22), ein anderer weist dagegen ein vorwiegend granuläres Grundplasma auf, das einzelne Membranen des endoplasmatischen Retikulums und Mitochondrien enthält.

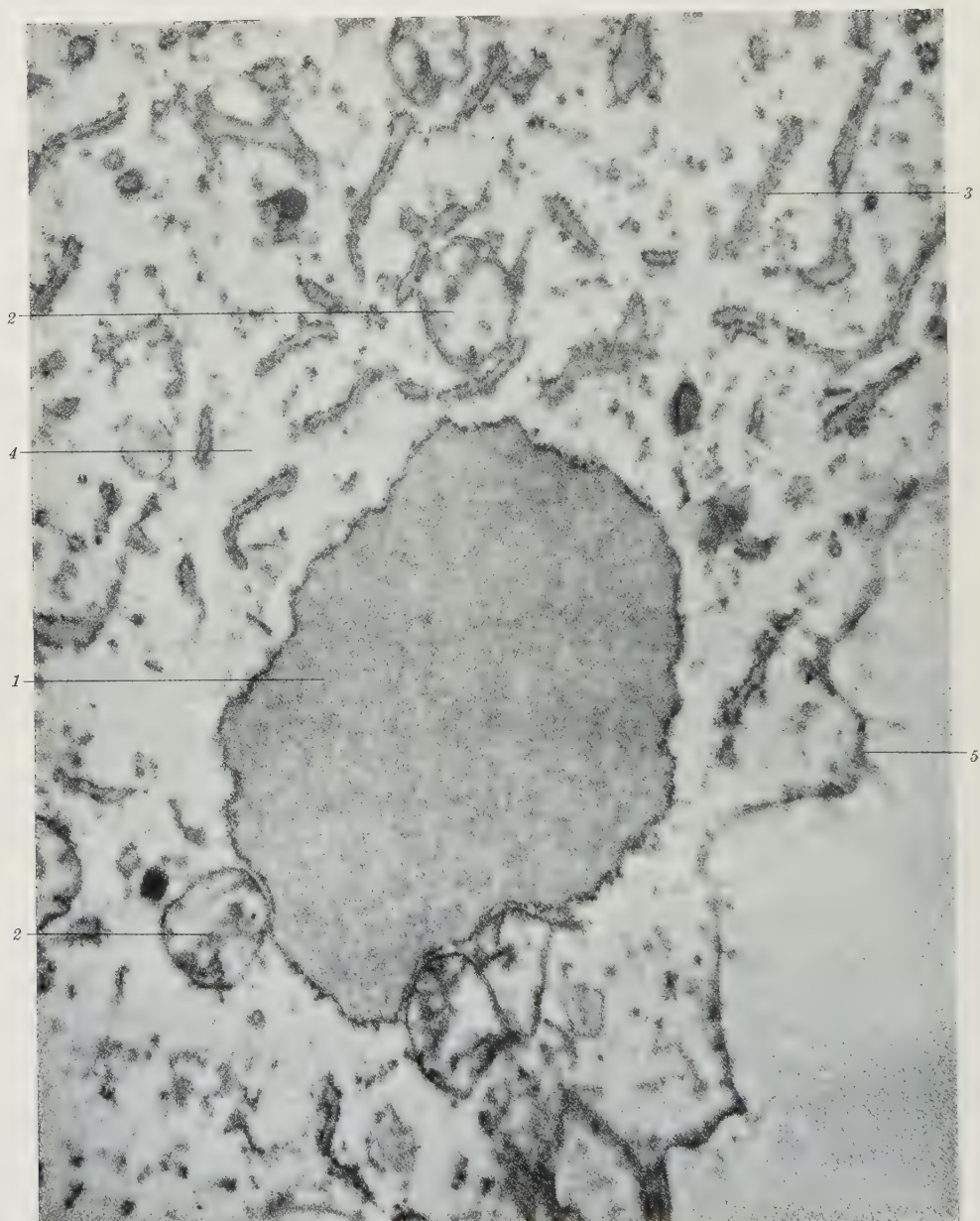


Abb. 24. Ausschnitt aus einer hypertrophen Knorpelzelle. 1 Großer Zisternensack; 2 den Membranen des endoplasmatischen Retikulum anliegende Mitochondrien; 3 endoplasmatisches Retikulum mit gleichbreitem intermembranösem Spalt; 4 Hyaloplasma mit wenig Granula; 5 Zellmembran.
Vergr.: 27 000

Auf zum Teil je nach Appositionsort verschiedenen Wegen entstehen damit die hypertrophen Knorpelzellen (Abb. 23). Das Plasmalemm der voll ausgebildeten *hypertrophen Knorpelzelle* behält bei Osmiumfixierung noch an vielen

Orten den Kontakt mit der Interzellulärsubstanz, an anderen Stellen sind die Haftpunkte an scheinbaren Zellfortsätzen zu erkennen. Der Schrumpfraum zwischen Zelle und Interzellulärsubstanz ist recht schmal. Die Kerne der hypertrophen Knorpelzellen sind vielgestaltig, d. h. mit einzelnen schmalen Fortsätzen oder mit plumpen lappenartigen Ausläufern versehen; zum Teil erscheint

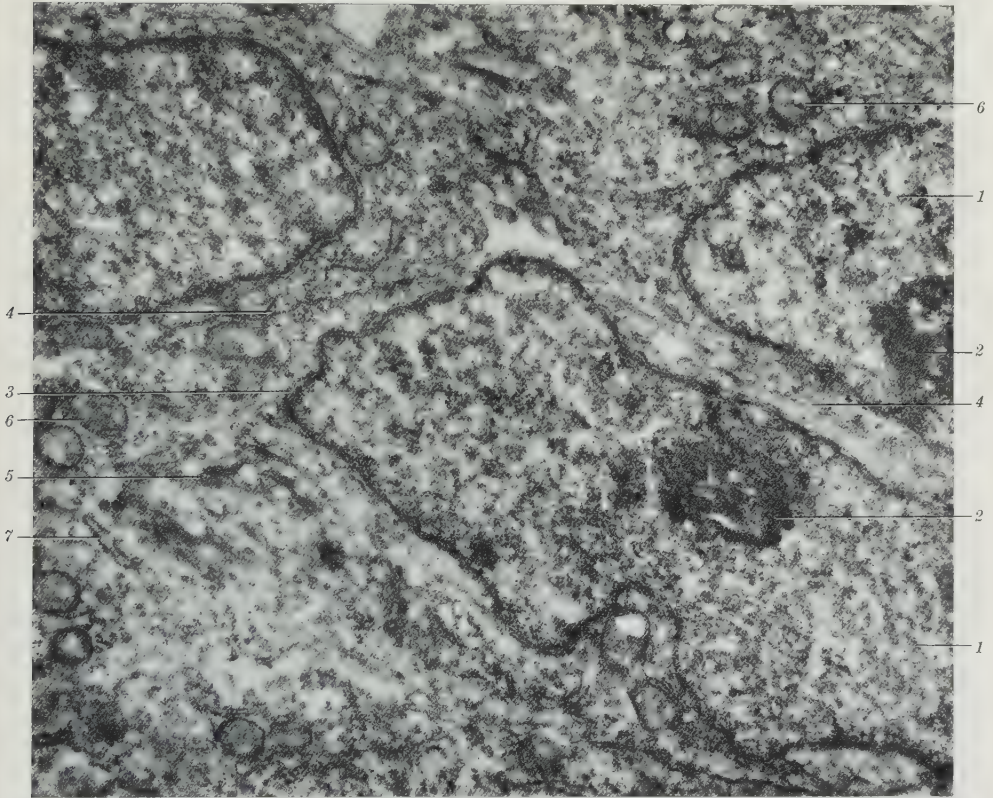


Abb. 25. Zellen des Vorknorpelblastems. 1 Kern; 2 Nukleolus; 3 Kernmembran; 4 Plasmalemma benachbarter Zellen mit schmalen Interzellularspalt; 5 Golgi-Feld mit Bläschen, dunklen Körpern und Golgi-Lamellen; 6 Mitochondrien; 7 endoplasmatisches Retikulum. Vergr.: 20 000

der Kern in der Form eines mehrfach gebogenen bandartigen Gebildes mit tiefen Buchten. Das fein granuläre Chromatin ist gleichmäßig verteilt; mitunter liegen der Kernmembran auch Chromatinklumpen an; ein Nukleolus ist regelmäßig vorhanden. Im Cytoplasma liegen verstreut kürzere oder längere, häufig miteinander verbundene Teile des endoplasmatischen Retikulums. Die Weite der Zisternen ist im allgemeinen gering und gleichbleibend. Nur mitunter treten einzelne große Säcke oder mehrere sackartige längere Zisternen auf (Abb. 24). Den Membranen unmittelbar angefügt, zum Teil auch als Brücken zwischen zwei Membranpaaren, finden sich Reste eines dichteren Hyaloplasma. Ebenfalls an die Membranen angeschmiegt sind kleine Mitochondrien. Im übrigen ist der Zelleib elektronenmikroskopisch leer.

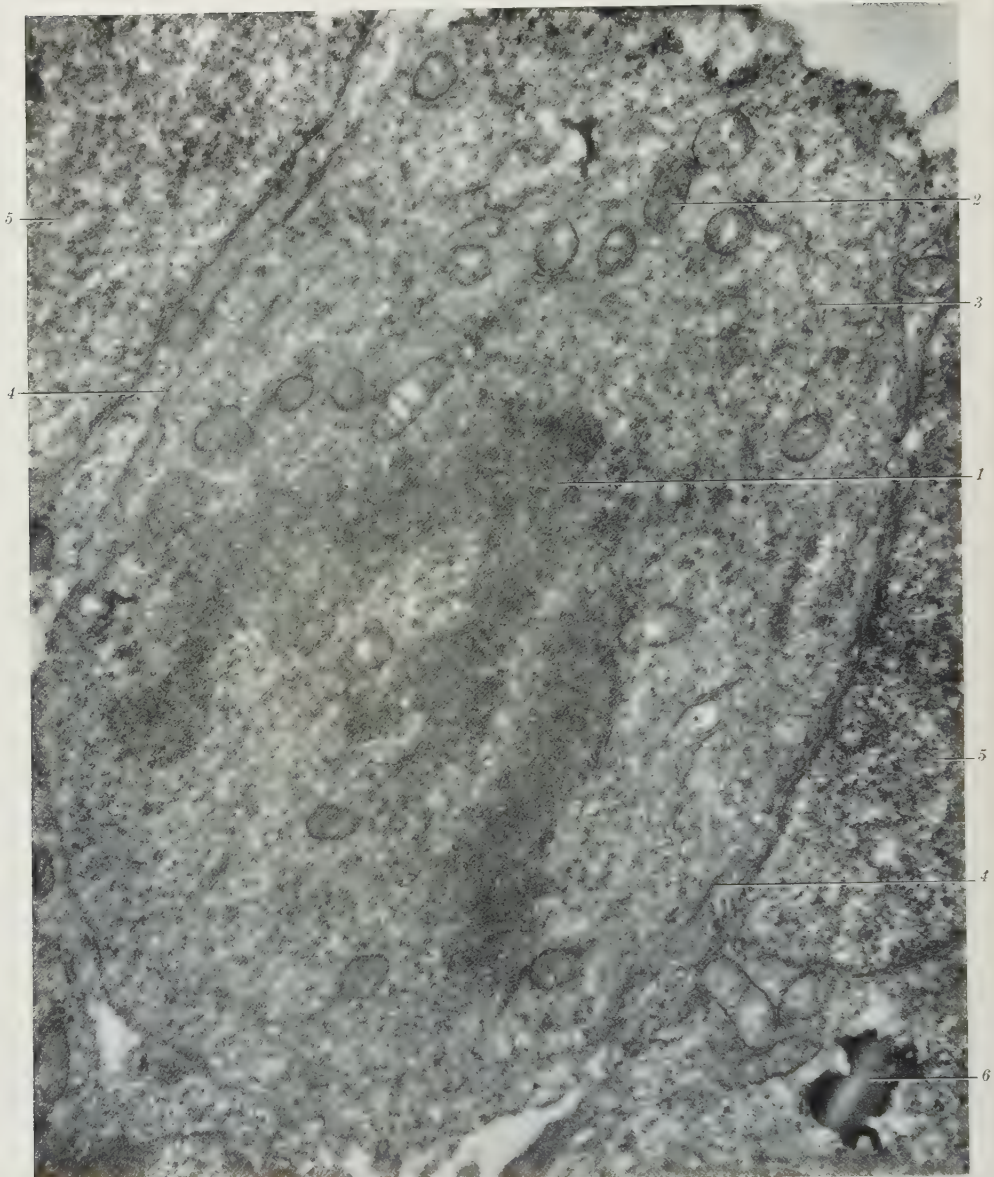


Abb. 26. Mitose einer Zelle des Vorknorpelblastem (Monaster). 1 Chromosomen; 2 Mitochondrien; 3 endoplasmatisches Retikulum; 4 Plasmalemma benachbarter Blastenzellen; 5 Zellkern der anstoßenden Blastenzelle; 6 osmiophile Einlagerung. Vergr.: 18 000

Wir haben weiterhin mit Osmium fixierten Knorpel mit *Hyaluronidase* und *Diastase* behandelt. Die Fibrillen der Fibroelastika des Perichondriums erscheinen dann unscharf begrenzt, ihre Querstreifung ist nicht deutlich bzw. überhaupt nicht mehr zu erkennen. Teile des Grundplasmas sowohl der Chondroblasten als auch der Chondrocyten sind durch beide Fermente herausgelöst.

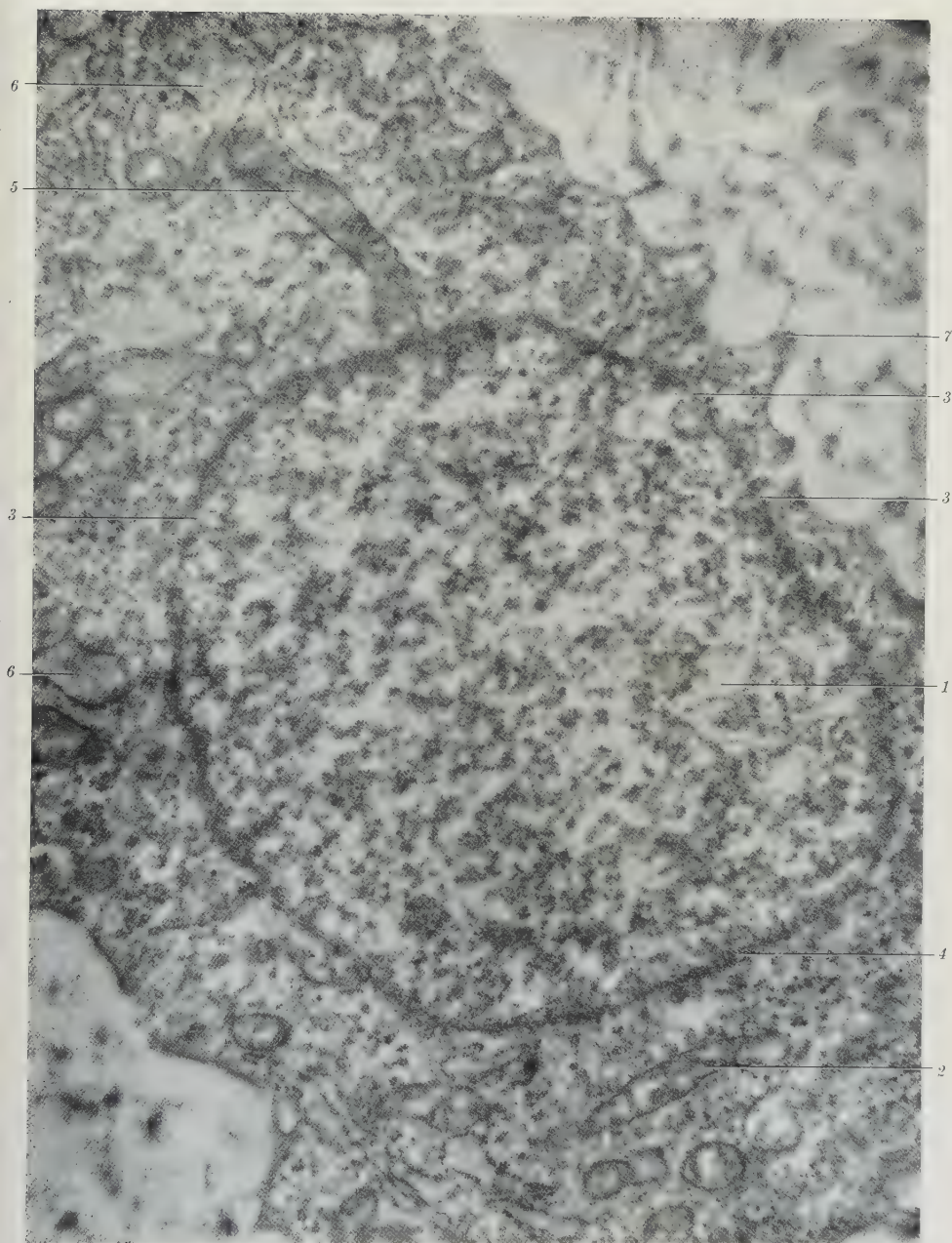


Abb. 27. Zellen des Vorknorpels. 1 Zellkern; 2 Kernmembran; 3 Kernporen; 4 Mitochondrien; 5 schlauchförmiges Mitochondrium in Kontakt mit der Kernmembran; 6 erweiterte Zisternen; 7 Plasmalemm im Kontakt mit der Interzellulärsubstanz. Vergr.: 25 000

Der Inhalt der Zisternen erscheint nach Hyaluronidasebehandlung wolkig aufgelockert, nach Diastaseeinwirkung bietet sie das Bild von Schollen. Gleichzeitig sind die Membranen teilweise zerstört.

4. Elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Entstehung des Vorknorpels

Im Hinblick auf die Umgestaltung des endoplasmatischen Retikulums konnten wir bei der Bildung des Vorknorpels ähnliche Beobachtungen wie am

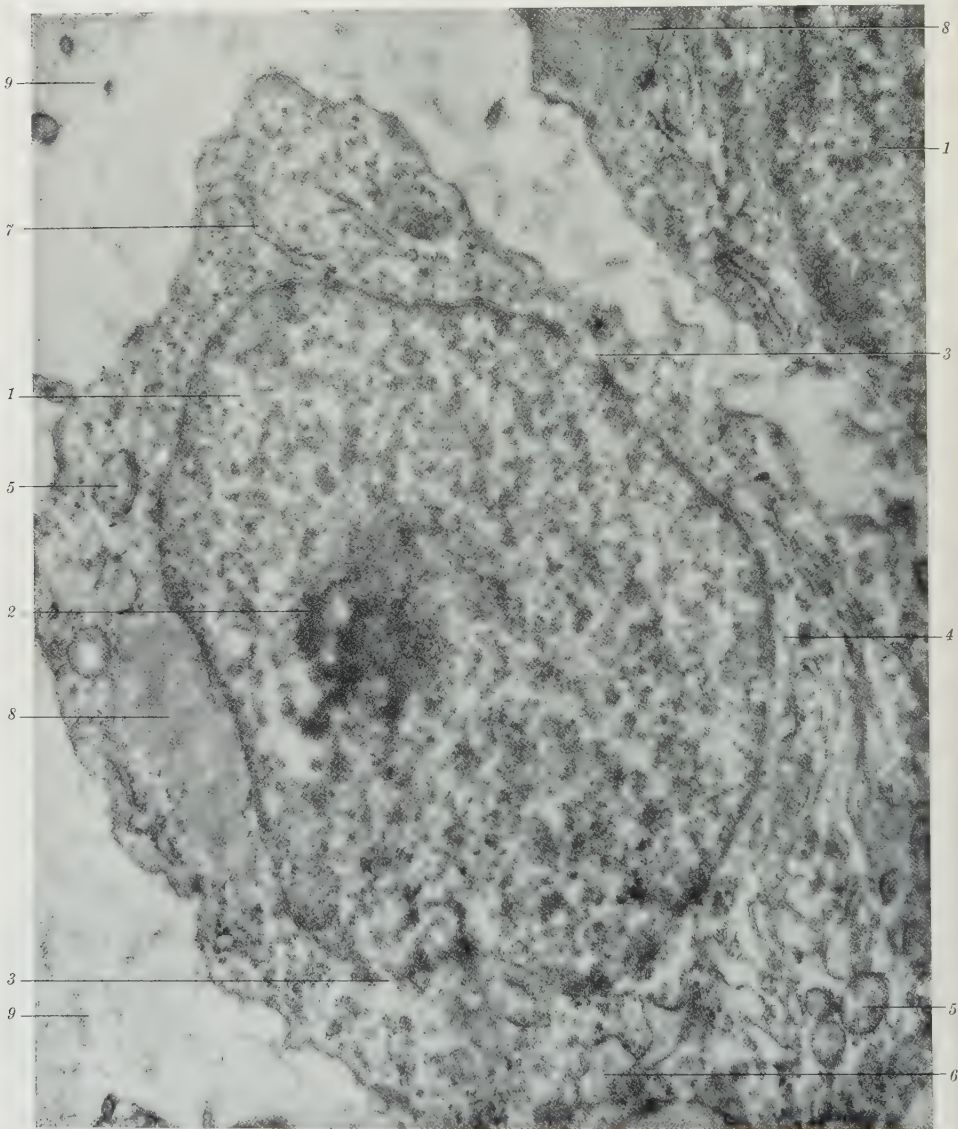


Abb. 28. Zellen des Vorknorpels. 1 Zellkern; 2 Nukleolen; 3 Kernporen; 4 Abhebung der äußeren Kernmembran mit Erweiterung des perinukleären Raumes; 5 Mitochondrien; 6 erweiterte Zisternen; 7 endoplasmatisches Retikulum; 8 homogene Cytoplasmazone; 9 Interzellulärsubstanz mit einer geringen Anzahl von Fasern. Vergr.: 21000

Knorpel machen. Das *Vorknorpelblastem* ist lichtmikroskopisch gegenüber dem umgebenden Mesenchym durch eine Ansammlung von Zellen auf engstem Raum ausgezeichnet. Die Zellen des Vorknorpelblastems stehen, wie elektronenmikro-

skopische Aufnahmen zeigen, so dicht, daß nur ein sehr feiner Interzellularspalt vorhanden ist (Abb. 25). Ein Synzytium konnten wir nicht beobachten. Im Vorknorpelblastem findet man, wie zu erwarten, viele Stadien von Mitosen.

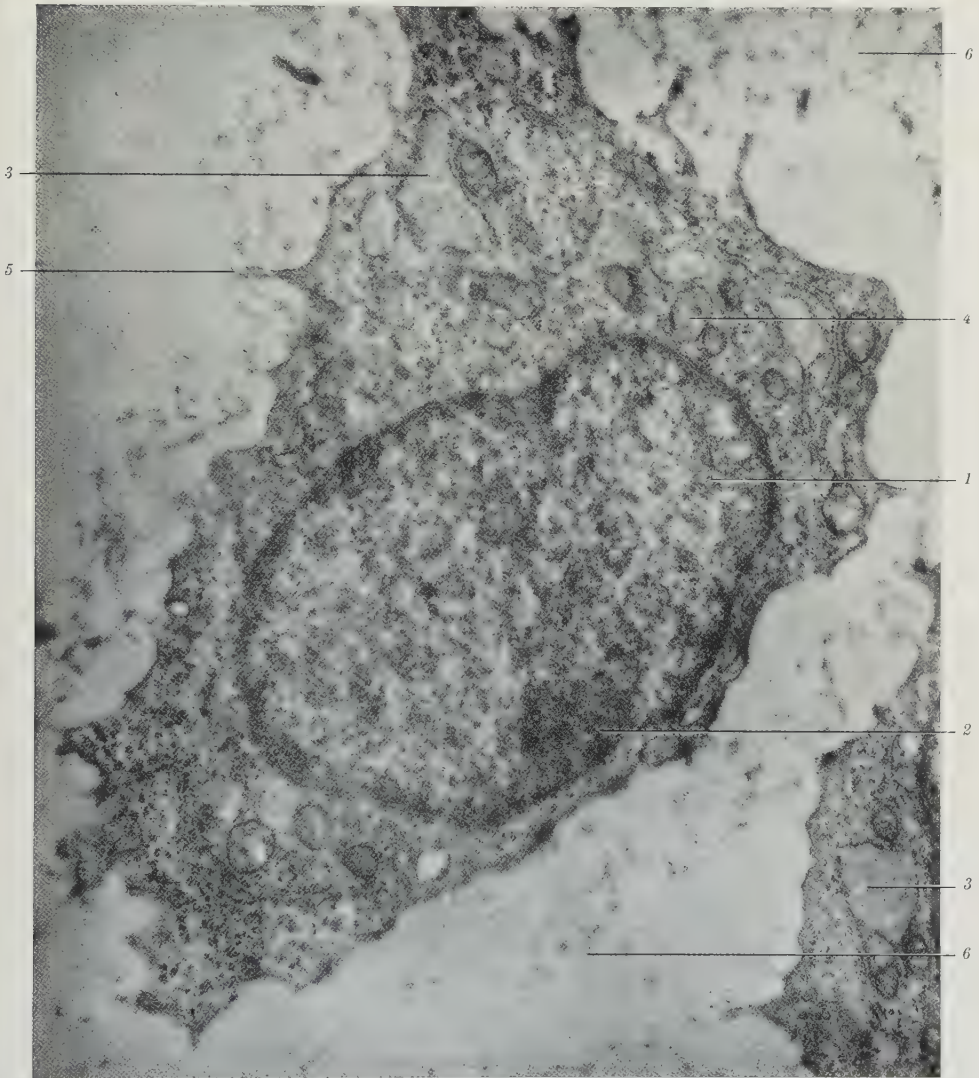


Abb. 29. Heranreifende Knorpelzelle. 1 Zellkern; 2 Nukleolus; 3 Zisterne; 4 Mitochondrien; 5 Zellfüße; 6 Interzellularsubstanz mit einer geringen Anzahl von Fasern. Vergr.: 21000

Der Kern der Blastemzellen besitzt einen großen Nukleolus und ein körniges, ungleichmäßig verteiltes Chromatin. Ihr Cytoplasma ist ungewöhnlich dicht und granulär strukturiert. In Kernnähe liegt ein Golgi-Feld mit Bläschen, größeren dunklen Körpern und glatten Membranen. Das endoplasmatische Retikulum ist gering entwickelt. Die Anzahl der rundlichen bis elliptoiden

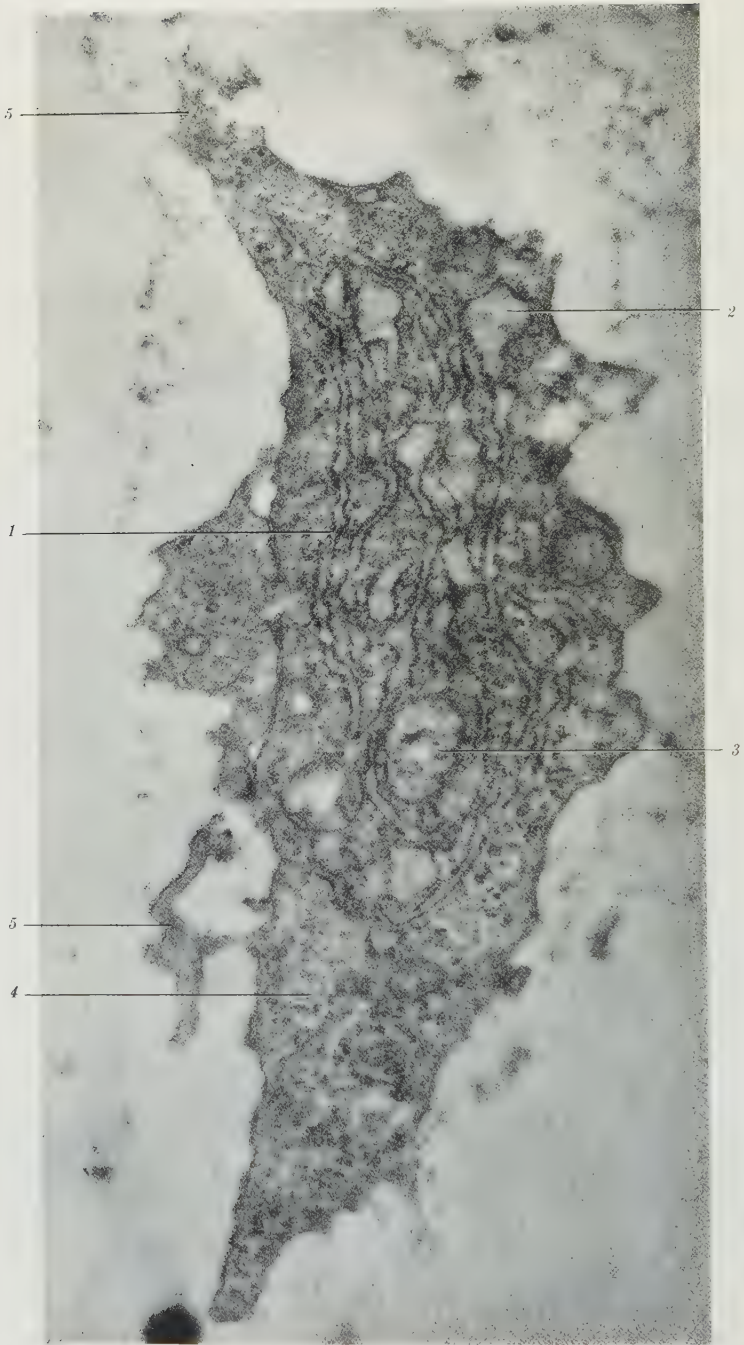


Abb. 30. Heranreifende Knorpelzelle. 1 Endoplasmatisches Retikulum; 2 erweiterte Zisternen; 3 Mitochondrien; 4 granuläres Hyaloplasma; 5 Zellfüße. Vergr.: 26000

Mitochondrien mit Cristae mitochondriales ist beachtlich hoch, besonders während der Mitose (Abb. 26).

Mit dem Erscheinen der Interzellulärsubstanz, d. h. der Bildung des *Vorknorpels*, erweitern sich die Zisternen in dem immer noch sehr spärlich entwickelten endoplasmatischen Retikulum (Abb. 27). Die Zisternen sind mit einer elektronenmikroskopisch homogenen Substanz erfüllt. Homogen erscheinende Bezirke ohne Membranhülle (Abb. 28), wie sie auch im hyalinen Epiphysenknorpel beobachtet wurden (Abb. 11), kommen vor. Die Zellen des Vorknorpels besitzen viele Mitochondrien, deren Gestalt von kugelig bzw. ovoid bis zu schlauchförmig wechselt. Mitunter legen sich Mitochondrien der Kernmembran an (Abb. 27), die durch eine große Zahl von Kernporen ausgezeichnet ist (Abb. 27, 28).

Das Heranreifen des Vorknorpels zum *hyalinen Knorpel* geht mit einer Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums in den Chondrocyten einher (Abb. 29). Zunächst bleibt die granuläre Struktur des Hyaloplasmas noch erhalten. Die Zisternen sind perlschnurartig erweitert. Weiter ist eine beachtliche Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums zu beobachten (Abb. 30), der vergrößerte Zisternen enthält. Die Mitochondrien werden von den Membranen des Ergastoplasmas eng umschlossen (vgl. auch S. 205).

IV. Diskussion

1. Die Ultrastruktur des Epiphysenknorpels

In der Literatur wurden bisher keine elektronenmikroskopischen Untersuchungen über das Perichondrium bzw. die Chondrogenese mitgeteilt. Wir erörtern daher zunächst die Ultrastruktur des Epiphysenknorpels.

Die *Chondrocyten des Appositionsknorpels* haben eine flache Gestalt. Ihre Längsachse liegt parallel zur Längsachse des Skeletstückes. Die Knorpelfibrillen verlaufen überwiegend tangential, d. h. parallel zur Oberfläche des Skeletstückes. In den tieferen Schichten des Epiphysenknorpels ist die Verlaufsrichtung der Fibrillen wechselnd.

SCHAFER (1930) und PETERSEN (1935, vgl. KNESE 1957) haben auf die verschiedene Lagerung der Fibrillen des Knorpels im Appositionsgebiet und in den tiefen Lagen des Epiphysenknorpels hingewiesen. Die verschiedene Orientierung der Fibrillen sollte durch eine Umlagerung (PETERSEN) bzw. Auflösung und Neubildung der Fibrillen (SCHAFER) entstehen. Wir schlossen uns auf Grund lichtoptischer Untersuchungen zunächst der Auffassung von SCHAFER an (KNESE 1957). Die elektronenmikroskopischen Beobachtungen lassen jedoch eher an eine Umlagerung der Fibrillen als Folge der Änderung der Zellgestalt denken. Bereits MÜLLER (1858) hat von „molekularen“ Verschiebungen im Knorpel gesprochen, da die Reihenordnung der Zellen des Säulenknorpels nach und nach entsteht. Zwischen den flachen Zellen des Appositionsknorpels und den rundlichen des Epiphysenknorpels liegen Zellen, die im Schnitt eine dreieckige Gestalt aufweisen. Es ist daher zu vermuten, daß ein schrittweiser Formwandel der Zellen mit Änderung der Fibrillenverlaufsrichtung vorliegt. Es könnte eine Umordnung der Fasern erfolgen, wie sie auch für andere Organe beschrieben wurde (vgl. WASSERMANN 1956). Jedoch konnten keine Befunde erhoben werden, die gegen die Auffassung von SCHAFER (1930) sprechen, nämlich eine Auflösung und Neubildung von Fibrillen.

Die Zellen des Appositionsknorpels besitzen ein endoplasmatisches Retikulum mit annähernd gleicher Breite der Zisternen. Die Abrundung dieser jungen Knorpelzellen zu jenen des hyalinen Epiphysenknorpels erfolgt unter Vergrößerung des hyaloplasmatischen Anteiles der Zelle. In den Zellen des zentralen

Teils des Epiphysenknorpels treten zunächst nur einige blasenartige Sinus auf. Bei der Umwandlung zu Zellen des Proliferations- und Säulenknorpels drängt der Zisternenraum das Hyaloplasma auf kleinste Bezirke zusammen. Die Zellen erscheinen sowohl mit Substanzen des Zisternenraumes als mit Grundplasma voll angefüllt. Die Metamorphose von Zellen des Proliferationsknorpels zu solchen des Säulenknorpels vollzieht sich unter Verkleinerung und Abplattung der Zellen. Es kann zur Zeit nicht entschieden werden, worauf die Volumenabnahme der Zellen beruht. Für eine Ausschüttung von Interzellulärsubstanz konnten wir elektronenmikroskopisch keine Anhaltspunkte auffinden (s. S. 251).

Die Umwandlung zu *hypertrophen Zellen* geht sehr rasch vor sich. Das Grundplasma der stark vergrößerten Zelle erscheint elektronenmikroskopisch leer. Einzelne dichtere Reste des Hyaloplasmas liegen den mit Palade-Granula besetzten Membranen des endoplasmatischen Retikulums an und enthalten kleine Mitochondrien. Das endoplasmatische Retikulum besteht aus einem den Kern annähernd konzentrisch umgebenden System kurzer Zisternen und einzelner größerer Säcke von 18000—48000 Å Durchmesser.

Unsere Beobachtungen reichen nicht aus, um den Strukturwandel der Zelle des Säulenknorpels bei ihrer Umgestaltung zu einem hypertrophen zu deuten. Elektronenmikroskopische und histochemische Befunde sprechen dafür, daß es in den hypertrophen Knorpelzellen zu einer *Substanzverschiebung* aus den Zisternen in den ganzen Zelleib kommt. Es wurde bereits angedeutet (S. 230), daß für diese Substanzverschiebung zwei Möglichkeiten zur Diskussion stehen, die sich nicht gegenseitig ausschließen: 1. Das Zisternenmaterial ist durch die Membranen hindurchgetreten. 2. Der Zelleib der hypertrophen Knorpelzellen besteht aus dem ursprünglichen Zisternenraum, das endoplasmatische Retikulum verschwindet bei der Umwandlung ganz oder teilweise und wird neu gebildet. Auf einen etwaigen Übertritt von Zisternenmaterial in den Zelleib kann man eine elektronenmikroskopisch nachweisbare Auflockerung und wohl auch eine Änderung des Flüssigkeitsgehaltes der Zelle beziehen. Eine derart tiefgreifende Strukturänderung von Zellen kann leicht den Eindruck ihres Absterbens erwecken. Unsere Kenntnisse über Entstehung und Differenzierung von Zellstrukturen sind jedoch noch so gering, daß eine befriedigende Deutung dieses Strukturwandels nicht möglich ist.

Unsere Beobachtungen über die Struktur des Knorpelgewebes sind Angaben der Literatur gegenüberzustellen. Zunächst ist der Einfluß der *Fixierung* auf die Knorpelstrukturen zu erörtern.

CAMERON und ROBINSON (1958), die die distale Femurepiphyse neugeborener Kinder untersuchten, verzichten auf die Schilderung der Zellstrukturen, da postmortale Veränderungen nicht auszuschließen seien. SCOTT und PEASE (1956), CAMERON und ROBINSON (1958) ZELANDER (1959) sowie TAKUMA (1960) beschreiben helle Höfe um die Zellen des Proliferations- und hypertrophen Knorpels. Die Autoren lehnen die Möglichkeit einer Fixierungsschrumpfung ab, da diese Höfe um die Zellen des Ohrknorpels (SHELDON und ROBINSON 1958) und Gelenknorpels fehlen. CAMERON und ROBINSON (1958) erwägen, daß es sich um ruhende Zellen handeln könne, die keine Interzellulärsubstanz produzieren. Eine regional verschiedene Schrumpfung je nach dem Gehalt an wasserlöslichen Stoffen ist durchaus denkbar. Zellfüße (vgl. unsere Abb. 12) — auch von ZBINDEN (1952/53) und DURNING (1958) beschrieben — sprechen für eine Verbindung der Zelle mit der Interzellulärsubstanz. Nach DURNING fehlen sie den voll ausgebildeten hypertrophen Zellen, doch konnten wir sie auch an ihnen beobachten. Unsere Gegenüberstellung von mit Osmium und Formalin

fixierten Chondrocyten ergibt, daß diese sog. Höfe Schrumpfungsprodukte sind. DURNING (1958) sah die Zellen nach Gefriertrocknung die Lakunen voll ausfüllen; er ist ebenfalls der Meinung, die bei Osmiumfixierung auftretenden Spalten entstünden durch Schrumpfung.

Die Fixierung ist offensichtlich auch für die Darstellung der *Fibrillenstruktur* des Knorpels verantwortlich. Die Fibrillen werden als nicht quergestreift, quergestreift usw. beschrieben (ZBINDEN 1952/53, 1953; MARTIN 1953, 1954; CAMERON und ROBINSON 1958; ZELANDER 1959, TAKUMA 1960). In unserem formalinfixierten Material treten fast ausschließlich quergestreifte Fibrillen auf. Ihre Struktur wurde von uns allerdings nicht weiter verfolgt, da sie außerhalb unserer Fragestellung lag. Möglicherweise bedingt die Kombination mit der großen Menge von MPS im Knorpel derartige Fixationsunterschiede. Gleichartige Erwägungen stellte ZBINDEN an (1952/53); allerdings konnte er bei Osmiumfixierung eine Querstreifung sehen, während er sie bei Formalinfixierung vermißte. Wie die Bilder der vollkommen körnig zerfallenen Chondrocyten zeigen, hat das Material von ZBINDEN schwere postmortale Veränderungen erfahren. DURNING (1958) hat osmiumfixierten und gefriergetrockneten Knorpel miteinander verglichen: Im Cytoplasma der Chondrocyten sind nach Gefriertrocknung Bläschen von 500—1000 Å Durchmesser zu beobachten, die dem endoplasmatischen Retikulum bei Osmium-Fixierung entsprechen sollen; das endoplasmatische Retikulum entsteht nach der Meinung von DURNING als Fixierungsartefakt aus den Bläschen. In der Interzellularsubstanz sind nach Gefriertrocknung eine homogene Substanz und lange Platten von 500 Å Dicke zu sehen. Durch Osmiumfixierung sollen diese Platten zerbrochen werden und dann als Knorpelfibrillen erscheinen. Uns scheinen noch nicht genügend allgemeine und spezielle Studien über den Einfluß der Fixierung vorzuliegen, die eine Stellungnahme zu den Ausführungen von DURNING (1958) ermöglichen.

Weitere Angaben über die Struktur der Chondrocyten bestätigen unsere Beobachtungen. SCOTT und PEASE (1956) beschreiben die Strukturänderung der Zellen des Epiphysenknorpels als Hydratation und Hypertrophie, die nicht die Zellorganellen, sondern das Hyaloplasma betreffen soll. Erweiterungen des Zisternenraumes werden von SCOTT und PEASE (1956) ZELANDER (1959) und TAKUMA 1960 erwähnt (s. unten). Die Autoren beschreiben das endoplasmatische Retikulum, die verschieden dicht gelagerten Palade-Granula und Mitochondrien. In der Verkalkungszone komme es zu Vakuolenbildung und Kernpyknose, einzelne Mitochondrien und Reste von Membranen seien erhalten. Die Chondrocyten enthalten Strukturen, die an einen Golgi-Apparat denken lassen. Diese Deutung wird aber von ZELANDER (1959) abgelehnt, da er keine Golgi-Lamellen beobachtet hat. Wir konnten jedoch in Chondrocyten eine größere Anzahl glatter Lamellen sehen, während in den Chondroblasten nur einzelne kürzere glatte Lamellen aufzufinden sind. Strukturlose Bezirke des Cytoplasmas, mitunter in der Nachbarschaft des Plasmalemm gelegen, halten SHELDON und ROBINSON (1958), DURNING (1958) und ZELANDER (1959) für Glykogendepots. Wir beobachteten diese strukturlosen Bezirke im Cytoplasma von Chondrocyten und Zellen des Vorknorpels, fanden aber keinen Anhaltspunkt dafür, der eine Bestätigung der von den genannten Autoren ausgesprochenen Vermutung ermöglicht.

Wie der vorstehende Überblick über die Literatur zeigt, konnten wir eine bisher fehlende detaillierte Beschreibung der Ultrastruktur der Chondrocyten in den einzelnen Regionen des Epiphysenknorpels vorlegen.

2. Das endoplasmatische Retikulum in Chondroblasten und Chondrocyten

Eine charakteristische Umgestaltung des endoplasmatischen Retikulums ist nicht nur bei den Chondrocyten, sondern auch bei den Zellen des *Perichondrium*s zu beobachten. Unsere elektronenmikroskopischen Befunde weisen eine Art Fibroelastika des Perichondrium nach, in der durch Zellen etwa vom Habitus der Fibroblasten Kollagenfibrillen gebildet werden. Das endoplasmatische Retikulum dieser Zellen ist gering entwickelt und der intermembranöse Spaltraum von annähernd gleicher Weite; nur an einigen Orten ist er etwas verbreitert. Die interzellulär gelegenen Kollagenfibrillen scheinen von einer dünnen Schicht elektronenmikroskopisch strukturloser Substanz umgeben zu sein. Aus der

Wirkung von Hyaluronidase ist zu schließen, daß diese strukturlose Substanz der Fibroelastika aus MPS besteht.

Bei der Umwandlung von Stammzellen des Perichondriums zu Prächondroblasten und Chondroblasten kommt es unter anderem zur Erweiterung der Zisternen auf 3000—4000 Å in der Form einzelner Blasen. Infolge der Vergrößerung der Zisternen wird das ursprüngliche Volumenverhältnis von Hyaloplasmaraum zu Zisternen zugunsten dieser Zisternen verschoben. Dieser Befund spricht für die Auffassung von PORTER (1956) und PALADE (1956), daß in dem System ein netzartig ausgebreiteter, von Membranen umgrenzter Raum vorliegt.

Die Umwandlung der Prächondroblasten zu den Chondroblasten einerseits und der Zellen des Appositionsknorpels zu jenen des hypertrophen Knorpels andererseits ist mit einer Umgestaltung des endoplasmatischen Retikulums verknüpft. Es treten zunächst vereinzelt, dann gehäuft, sackartige Erweiterungen der Zisternen auf. Die Zisternen enthalten ein elektronenmikroskopisch dichtes homogenes Material. Durch die Zisternenerweiterungen wird das Hyaloplasma erheblich eingeeengt. Unsere Befunde lassen vermuten, daß dieses Zisternenmaterial in den hypertrophen Knorpelzellen sicherlich den ganzen Zelleib einnimmt.

Die elektronenmikroskopischen Erhebungen müßten sich mit der Beschreibung eines Verteilungsmusters von Zellen mit einer charakteristischen Ausgestaltung der Zisternen begnügen. Dieses Verteilungsbild verhält sich aber wie ein Negativ zum Positiv der Ablagerungsorte von S³⁵ und dem Auftreten der metachromatischen Farbreaktion (s. S. 248). Da beide Erscheinungen unter bestimmten präparativen Voraussetzungen auf dem Vorhandensein von Sulfo-MPS beruhen, lag auf Grund der topographischen Beziehungen die Vermutung nahe, die beobachteten Zisternenerweiterungen stünden mit der MPS-Bildung in Zusammenhang. Ein Versuch der Bestätigung dieser Annahme wurde mit Hydrolyse durch Hyaluronidase und Diastase gemacht, die einen scholligen Zerfall des Zisterneninhaltes ergab.

In vielen bisher untersuchten Zellen erscheint das endoplasmatische Retikulum als ein System von Doppelmembranen (vgl. SJÖSTRAND (1956) Beschreibung von sog. α -Cyto-membranen). Das Vorkommen einzelner Erweiterungen und Verbindungen zwischen den intermembranösen Spalträumen spricht dafür, daß es sich hier um ein endoplasmatisches Retikulum handelt, das von Membranen umgrenzt wird (PALADE 1956). Die Arbeitsgruppen von PALADE und PORTER sowie SJÖSTRAND sind sich darin einig, daß zwischen den Membranen ein anderes Milieu vorliegt als im Hyaloplasma. Nach PORTER (1953) enthalten die Zisternen ein wäßriges Milieu, nach SJÖSTRAND (1956) Lipide, die bei der Fixierung herausgelöst würden.

Erweiterungen des Zisternenraumes in Zellen anderer Organe, d. h. nicht in Stützgeweben (s. unten), wurden verschiedentlich beschrieben (PORTER 1954, PALADE und PORTER 1954, HAGENAUF 1958). WEISS (1958) spricht von ergastoplasmatischen Säcken, WATANABE (1955) von intracytoplasmatischen Säcken in den Pankreaszellen der Maus. DEMPSEY und PETERSON (1955) halten die dichte homogene Substanz in den erweiterten Ergastoplasmaräumen der Schilddrüsenzelle für Kolloid (vgl. WISSIG 1960). HENDLER u. Mitarb. (1957) finden in den Albumin produzierenden Zellen des Hühnereileiters Zisternensäcke, die mit einer amorphen Substanz angefüllt sind. Eine Beziehung zwischen Zisterneninhalt und dem Sekretionsprodukt dieser Zellen konnte durch Untersuchungen mit Hilfe markierter Aminosäuren wahrscheinlich gemacht werden. Das endoplasmatische Retikulum erweist sich also als ein komplexes System (PALADE 1956), das wechselnde Aufgaben erfüllt. Eine Deutung der an einem Orte aufgefundenen Zisternenerweiterungen ist daher nur durch Heranziehung weiterer Beobachtungen möglich.

Auch in Zellen der *Stützgewebe* wurden verschiedentlich Erweiterungen der Zisternen nachgewiesen. Bereits die elektronenmikroskopischen Beobachtungen an periostalen Osteoblasten (KNESE und KNOOP 1958) ergaben die Existenz eines kommunizierenden Spaltraum-Komplexes. Die Erweiterungen der Zisternen in den knochen nahen Gebieten der Osteoblasten (vgl. hier auch SCOTT und PEASE 1956, ASCENZI und BENEDETTI 1959) können so stark sein, daß das Hyaloplasma auf schmale Straßen eingeschränkt wird. Zisternensäcke in Chondrocyten haben SCOTT und PEASE (1956), ZELANDER (1959), TAKUMA (1960) und PUTSCHAR (1960), in *Mesenchymzellen* bzw. *Fibroblasten* des Hühnerkeimes (GIESEKING 1959, 1960), in Odontoblasten NYLEN und SCOTT (1958) festgestellt.

In den Lakunen erfolgt nach GIESEKING die Synthese von mizellaren Vorstufen „der Fasersubstanz, die vielleicht mit dem Tropokollagen identisch sind“. Die Membranen des endoplasmatischen Retikulums bleiben bis zur intrazellulären Ausfällung fibrillärer Elemente erhalten. Dann kommt es zum Zusammenbruch des endoplasmatischen Retikulums und zur Eröffnung des Hohlraumsystemes. GIESEKING (1960) meint, daß „der beschriebene Mechanismus der faserigen Differenzierung des Mesenchyms . . . auch jedem anderen Prozeß der Neubildung bindegewebiger Fasersubstanzen zugrunde“ liegt. Auf eine Diskussionsbemerkung von LINDNER antwortet GIESEKING (1960), daß bei der angewendeten Präparationstechnik MPS nicht in Erscheinung treten.

Lakunäre Zisternen der *Fibroblasten* in der von GIESEKING (1959, 1960) abgebildeten Größe und Anzahl haben auch wir beobachtet. Indessen sind die Zisternensäcke in Chondroblasten und Chondrocyten nicht nur größer als in den Fibroblasten, sondern auch zahlreicher. So wäre bereits auf Grund des morphologischen Befundes zu vermuten, daß die Zisternensäcke mit einer Stoffproduktion in Verbindung stehen, die bei Fibroblasten in geringem, Chondroblasten aber in verstärktem Umfange stattfindet. Da unseren morphologischen Befunden die Resultate biochemischer und autoradiographischer Untersuchungen entsprechen, kamen wir zu der — später zu begründenden — Annahme (s. S. 245), daß die Zisternerweiterungen mit der Synthese des MPS-Protein-Komplexes zu tun haben. Wir vermuten, daß die Zisternensäcke der Fibroblasten zum Teil im Zusammenhang mit der Bildung der Polysaccharidkomponente der Fibrillen, zum Teil der umhüllenden MPS-Substanz entstehen.

3. Synthese der MPS

Unseren elektronenmikroskopischen Beobachtungen sind nunmehr autoradiographische und biochemische Untersuchungen über den Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel der Knorpelzellen gegenüberzustellen. Es soll dabei geprüft werden, ob die Ergebnisse dieser Studien in bezug auf die MPS-Synthese mit unseren morphologischen Befunden an Chondroblasten und Chondrocyten vereinbar sind, vor allem im Hinblick auf die Umgestaltung des endoplasmatischen Retikulums.

FOLLIS (1952) konnte noch feststellen, der Bildungsort der organischen Interfibrillärsubstanz des Stützgewebes sei unbekannt. Spätere Untersuchungen haben die *Bildung der MPS durch Zellen* klargestellt (CURRON 1953; KLING und CAMERON 1955; GROSSFELD u. Mitarb. 1955, 1956, 1957; MANZINI u. Mitarb. 1956; TAYLOR u. Mitarb. 1956; YIELDING u. Mitarb. 1957; BEVENSON u. Mitarb. 1958). Autoradiographische Untersuchungen mit S^{35} -Sulfat haben gezeigt, daß S^{35} zuerst (1—2 Std nach Verabreichung) in den Zellen erscheint und später (24 Std) in die Interzellulärsubstanz übertritt (BÉLANGER 1954, AMPRINO 1955). Die S^{35} -Bindung ist eine Zelleistung, da sie nach Zerkleinerung der Zellen, nach

Kalte- oder Hitzebehandlung ausbleibt (BOSTRÖM und MANSSON 1953, PELC und GLÜCKSMANN 1955). Es wird ein aktives Sulfat gebildet (HILZ und LIPMANN 1955), und zwar ein Adenosin-3'-phosphat-5'-phosphosulfat (ROBBINS und LIPMANN 1956). Das aktive Sulfat entsteht durch eine zweiphasige enzymatische Synthese (ROBBINS und LIPMANN 1958a, 1958b). GREILING und BANDITZ (1959) fanden bei der Zellfraktionierung von Rattenleber ein Enzym, die Chondroitinsulfatase, die das Sulfat von dem genannten aktiven Sulfat auf die Chondroitinschwefelsäure und das Chondroitin überträgt. Den Sulfateinbau in die Chondroitinschwefelsäure erklären die Autoren damit, daß noch freie, nicht veresterte OH-Gruppen am C₄ des Galactosamin vorhanden sind.

Nach DZIEWIATKOWSKI (1951), BOSTRÖM u. Mitarb. (1952), BOSTRÖM u. Mitarb. (1952) wird das S³⁵ in die *Chondroitinschwefelsäure* eingebaut, da die Ablagerung nach Hyaluronidasebehandlung nicht mehr nachweisbar ist (BÉLANGER 1954, GREULICH 1956). Über die Aufnahme von S³⁵ in andere Stoffe vgl. DZIEWIATKOWSKI (1958), FRIBERG (1958, s. unten). Die Verteilung der S³⁵-Einlagerungen entspricht dem Auftreten einer metachromatischen Farbreaktion. Die Stärke der Radioaktivität nimmt zu den hypertrophen Knorpelzellen hin zu (BÉLANGER 1953, 1954, 1956; ENGFELDT u. Mitarb. 1954a, 1955); nach VERNE u. Mitarb. (1956) ist sie bei der Katze im Säulenknorpel stärker als im hypertrophen.

Bei den bisherigen biochemischen Untersuchungen des Epiphysenknorpels stand im Vordergrund die Aufklärung der *Glykolyse*. Der seit langem bekannte Glykogengehalt der Knorpelzellen (vgl. SCHÄFFER 1930) und das Verschwinden des Glykogens in der Eröffnungszone ließen an einen unmittelbaren Zusammenhang mit der Kalkeinlagerung denken, vor allem seit ROBISON (1923) alkalische Phosphatase im Knorpel nachwies (vgl. über Phosphatase BOURNE 1956). ROBISON und ROSENHEIM (1934) kommen später allerdings zu der Annahme, daß noch ein „zweiter Mechanismus“ vorliegen müsse, der als Glykogenolyse erkannt wurde (GUTMAN 1946, GUTMAN u. Mitarb. 1949, GUTMAN u. Mitarb. 1949, 1950). Eine erneute Untersuchung der Glykogenverteilung führten HARRIS (1932, 1933), GENDRE (1938), GLOCK (1940), FOLLIS (1949), LEYNSE (1952), EEG-LARSEN (1956) durch. Die Enzyme der Glykolyse wiesen GUTMAN u. Mitarb. (1941), ALBAUM u. Mitarb. (1952a, 1952b) nach, das Auftreten von Milchsäure BYWATERS (1957), LUTWAK-MANN (1940) sowie EEG-LARSEN (1956). Die von EEG-LARSEN (1956) angegebenen Zeiten über den Aufenthalt der Knorpelzellen in den einzelnen Zonen müßten noch näher mit den autoradiographischen Angaben verglichen werden. Eine Zelle benötigt 30–45 Std., um von der Teilungszone in die Mineralisationszone zu gelangen, davon verbleibt sie 20–30 Std. in der Proliferations-, 7–15 Std. in der hypertrophen und 3–5 Std. in der Mineralisationszone.

Die Bildung *hochmolekularer Substanzen*, Proteine oder KH, in den Knorpelzellen haben GREULICH und LEBLOND (1953) auf Grund der Untersuchung der Ablagerung von C¹⁴ angenommen. Sie ist in den Zellen des Proliferationsknorpels gering und nimmt zu den hypertrophen Zellen hin erheblich zu, ist aber in der Eröffnungszone nicht mehr nachweisbar. Nach 72 Std. ist die Aktivität der Zellen geringer, die der Interzellularsubstanz stärker. Die Synthese gekoppelter Polysaccharide wird durch eine Amylo-1,4→1,6-Transglukosidase in den Zellen des Säulenknorpels ermöglicht (TAKEUCHI 1958).

Eindeutig für eine *Proteinsynthese* sprechen die Untersuchungen über die Ablagerung von S³⁵-Methionin und S³⁵-Cystin, die nach BÉLANGER (1955) auf die Glykoproteinfraktion bezogen werden kann, da Kollagen fast kein Cystin und nur wenig Methionin enthält. Methionin ist bereits nach 1 Std., Cystin nach 6 Std., unter anderem in den hypertrophen Knorpelzellen, den Prächondroblasten sowie Präosteoblasten nachweisbar (BÉLANGER 1956). NIKLAS u. Mitarb. (1956) haben die Höhe des Proteinstoffwechsels auf Grund der S³⁵-Methionin-Ablagerung im Säulenknorpel zu 33% und im Gelenkknorpel zu 2% derjenigen der Pankreaszelle bestimmt, die den höchsten Umsatz aufweist. Die Synthese von Peptidbindungen und damit Polypeptidketten wird durch Glutamin-Asparagin-Transaminase ermöglicht (DE BERNARD und SCHUBERT 1955 nach ZAMBOTTI 1957).

Über die Synthese und den *Stoffwechsel der MPS* liegen zusammenfassende Darstellungen vor unter anderem DORFMAN (1955/56), RODEN (1956), ZAMBOTTI (1957), DELAUNAY und BAZIN (1958), BAZIN und DELAUNAY (1959), auf die verwiesen wird. Zum Teil wurde angenommen, daß von den Zellen nur Bausteine der MPS geliefert würden (AMPRINO 1955; JACKSON und RANDALL 1956; MOORE u. Mitarb. 1957; SCHOENBERG u. Mitarb. 1957, 1958; ZELANDER 1959; TONNA und CRONKITE 1959). Andere Autoren vermuten dagegen eine Sulfatveresterung in hochpolymerem Zustand (BOSTRÖM u. Mitarb. 1954; MEYER u. Mitarb.

1956) (s. S. 251). GREULICH und LEBLOND (1953), BÉLANGER (1954, 1956) sowie AMPRINO (1956) sprechen bezüglich der Leistung der Knorpelzelle von einer „Sekretion“.

Die autoradiographischen und biochemischen Untersuchungen betreffen fast ausschließlich die *Knorpelzellen*. Die Stoffwechsel- und Enzymaktivität bei der Synthese des MPS-Proteinkomplexes der Zellen des hyalinen Epiphysenknorpels ist gering und nimmt schrittweise in Richtung auf die Zellen des Säulen- und hypertrophen Knorpels zu. Parallel zur Zunahme der Stoffwechselaktivität gestaltet sich, wie von uns beobachtet, das endoplasmatische Retikulum durch Erweiterung der Zisternen um. Der massiven Einlagerung von S^{35} bzw. C^{14} in den hypertrophen Knorpelzellen könnte der Übertritt des in den Zisternen gebildeten Materials in den ganzen Zelleib entsprechen. Es liegt demgemäß eine *regionale Übereinstimmung* zwischen Stoffwechsel- und Enzymaktivität der Chondrocyten im Hinblick auf die MPS-Proteinsynthese und der Ausbildung von Zisternensäcken in diesen Zellen vor, so daß man wohl zwischen beiden Erscheinungen einen Zusammenhang annehmen kann.

Die Literatur enthält nur wenige Angaben über die Stoffwechselaktivität der Zellen des *Perichondrium* (BÉLANGER 1955, z. T. AMPRINO 1955, Phosphatase: PRITSCHARD 1952). Den beachtlich erweiterten Zisternen der Chondroblasten stehen die schmalen Zisternen der Chondrocyten des Appositionsknorpels gegenüber. Damit ist die Annahme berechtigt, daß die Verengung der Zisternen im Übergang von den Chondroblasten zu den Chondrocyten mit der Bildung der hyalinen Interzellulärsubstanz zusammenhängt.

4. Das färberische Verhalten der Chondroblasten und Chondrocyten

Die Ergebnisse der angeführten autoradiographischen und biochemischen Untersuchungen sprechen für eine intrazelluläre Entstehung des MPS-Proteinkomplexes. Es ist zu erörtern, ob durch Methoden zur färberischen Darstellung von Kohlenhydraten bzw. MPS Zellstrukturen aufzuzeigen sind, die den elektronenmikroskopisch nachweisbaren entsprechen. Man kann erwarten, daß die größeren Zisternensäcke, die in Zellen des hyalinen Knorpels 10000—29500 Å, der hypertrophen 18000—48000 Å messen, lichtmikroskopisch als Granula erscheinen.

Verschiedentlich wurden PAS-positive Granula in Zellen des Stützgewebes beschrieben (GERSH u. Mitarb. 1949 in Fibroblasten; MANZINI u. Mitarb. 1951 in Mesenchymzellen; FOLLIS und BERTHRONG 1949, HELLER-STEINBERG 1951, PRITSCHARD 1952 in Osteoblasten). Dagegen beobachtet McMANUS (1954) in Fibroblasten keine PAS-positiven Granula. KNESE (1959) konnte PAS-positive Granula nur in den Osteoblasten der Diaphysenmitte, aber weder an deren Ende, noch im Perichondrium auffinden. Allerdings fanden sich in den Zellen des Vorknorpelblastems kleiner Rinderfeten unter 40 mm SSL, d. h. in Mesenchymzellen, PAS-positive Granula. Die Zellen des sich differenzierenden Vorknorpels eines Feten von 39 mm SSL enthalten Granula, diejenigen eines Feten von 21,6 mm SSL dagegen sind frei von Körnchen.

Die PAS-positiven Granula in den Skeletzellen fallen im Lichtmikroskop durch ihre scharfe Begrenzung auf. Zellräume, die als elektronenmikroskopisches Äquivalent solcher Granula aufzufassen sind, liegen der Größe von 1—5 μ nach nur in den sackartigen Zisternen vor. Darüber hinaus konnten wir keinerlei Strukturen beobachten, die den lichtmikroskopisch erkennbaren Granula zuzuordnen sind.

Aus den eigenen Untersuchungen ist hinzuzufügen, daß BTS-färbbare Granula entweder in allen Zellen des Säulenknorpels oder in größerer Menge stets in der Nähe des hypertrophen Knorpels nachzuweisen sind. PAS-positive Zellgranula fehlen dagegen regelmäßig in einem größeren Bereich des Säulenknorpels. Indessen sind derartige Granula nach Vorbehandlung mit Hyaluronidase darzustellen. Bekanntlich weist die BTS-Reaktion auf das Vorhandensein von α -Hydroxysäuren, die PAS-Reaktion auf α -Aminoalkoholradikale hin (LIPP). Diese Befunde lassen sich im Augenblick nicht deuten.

Bei *Escherichia coli* B fanden CEDERGREN und HOLME (1959) Vakuolen, die der Größe und Menge nach dem Glykogenvorkommen entsprechen und unabhängig von der Fixierung und Einbettungstechnik vorhanden sind. THEMANN (1960) hat in der Leberzelle nach Osmiumfixierung und Färbung mit Bestschem Carmin elektronenmikroskopisch feinverteiltes Glykogen festgestellt. Diese Befunde sind nicht ohne weiteres mit unseren an Chondroblasten und Chondrocyten erhobenen vergleichbar. KARRER (1960a, b) vermutet eine Beteiligung des Golgiapparates an der Glykogensynthese in den Leberzellen. Auch wir haben enge, wenn auch nicht aufzuklärende, Beziehungen zwischen Ergastoplasma und Golgiapparat in Chondroblasten und Chondrocyten beobachtet.

Die Kongruenz der Granula und der sackartigen Zisternen wird vor allem durch die in Knorpelzellen auftretenden Granula von 1,0—5,0 μ Durchmesser nahegelegt. Diese Granula lassen sich in stark saurem pH elektiv mit Toluidinblau färben und sind sowohl nach Hyaluronidase- als auch Diastase-Behandlung unsichtbar. Dieser Befund könnte den oben mitgeteilten elektronenmikroskopischen Beobachtungen über die enzymatische Veränderung des Zisterneninhaltes an die Seite gestellt werden. Die Granula sind weiterhin mit HALEs kolloidaler Eisenlösung blauschwarz darzustellen. Ihre PAS-positive Reaktion verschwindet wohl nach Diastase, aber nicht nach Hyaluronidase-Behandlung. Das unterschiedliche Verhalten der Granula nach Hyaluronidaseeinwirkung gegenüber Toluidinblau- und PAS-Färbung ist zur Zeit nicht erklärbar. Die Wirkung der Hyaluronidase besteht jedenfalls in einer Desaggregation, einer stufenweisen Depolymerisation und einer Spaltung zu Tetrasacchariden durch Testishyaluronidase, zu Oligosacchariden und Monosacchariden durch Bakterien-Hyaluronidase (MEYER 1947; GIBIAN 1954; WEISSMANN u. Mitarb. 1953, 1954; DORFMAN 1955/56).

Die Zu- oder Abnahme der *Metachromasie der Interzellulärsubstanz* (s. unten) nach Einwirkung von Ribonuclease bzw. Desoxyribonuclease ist schwer zu verstehen. Vielleicht enthalten auch die sog. rein kristallisierten Enzyme noch proteolytische Fermente, wie es BENDITT und FRENCH (1953) für ältere Hyaluronidasepräparate zeigten. Nach GIBIAN (1955) enthalten hochgereinigte Handelspräparate von Hyaluronidase noch 99 und mehr % Ballaststoffe. Möglicherweise beeinflussen kleine Beimengungen der Enzympräparate die organische Interfibrillärsubstanz derart, daß es zu einer Veränderung der metachromatischen Reaktion kommt.

Mit der Annahme, daß der Zisterneninhalt dem MPS-Protein-Komplex zuzuordnen ist, läßt sich die Feststellung vereinbaren, daß in den Zellen des Perichondriums lichtmikroskopisch weder Granula noch eine Metachromasie zu beobachten sind. Die Zisternerweiterungen in diesen Zellen besitzen mit 3000—4000 Å so geringen Durchmesser, daß eine etwaige Anfärbung ihres Inhaltes nicht erkennbar ist. Andererseits sind die hypertrophen Knorpelzellen durch eine diffuse Metachromasie des Zelleibes ausgezeichnet. Ihre Zisternen sind eng, seltener erweitert, ihr Hyaloplasma erscheint leer. Es ist anzunehmen, daß der MPS-Protein-Komplex aus den Zisternen in das Hyaloplasma übergetreten ist.

5. Die organische Interfibrillärsubstanz, ihre Zusammensetzung und färbereische Darstellung im Schnitt

Autoradiographische, biochemische und topochemische Untersuchungen sprechen für eine Stoffproduktion der Chondrocyten. Durch erstere wurde die Stoffabgabe an die Interzellulärsubstanz auch nachgewiesen. Vermutlich wird durch die Stoffproduktion nicht nur die Menge der Interzellulärsubstanz vermehrt, sondern die Interzellulärsubstanz in ihrer Zusammensetzung auch verändert. Demgemäß sollen im Hinblick auf diese Hypothese im folgenden unsere Kenntnisse über den Aufbau der organischen Interfibrillärsubstanz des Knorpels mit den Ergebnissen der Färbemethoden verglichen werden.

Die organische Interfibrillärsubstanz des Knorpels besteht zu etwa 75% aus einem MPS-Protein-Komplex. Das MPS ist die Chondroitinschwefelsäure.

Die Disaccharid-Einheit der *Chondroitinschwefelsäure* wird als N-acetyliertes D-Galaktosamin, D-Glucuronsäure und Schwefelsäure beschrieben. Die ursprüngliche Annahme, daß daneben als *Protein* nur Kollagen vorhanden sei (u. a. PARTRIDGE 1948), erwies sich als nicht zutreffend. Verschiedene Autoren isolierten Proteine, die vom Kollagen verschieden sind (SHETTON und SCHUBERT 1951, CONSDEN und BIRD 1954, WOODIN 1954, MATHEWS 1956). PARTRIDGE und DAVIS (1958) haben den unzerstörten MPS-Protein-Komplex aus dem Hyalinknorpel isoliert und vom Kollagen getrennt. Die Aminosäure-Analyse ergibt das Fehlen von Hydroxylprolin und einen hohen Gehalt an Tyrosin; sie bestätigt bzw. erweitert die Angabe der genannten Autoren. Diese Proteine unterscheiden sich auch von den Plasmaproteinen durch ihren abweichenden prozentualen Gehalt an Prolin, Serin, Glycin, Lysin und Arginin (PARTRIDGE und DAVIS 1958).

Sehr verschiedenartige Modi der *Bindung der Polysaccharide an Proteine* wurden erwogen (EINBINDER und SCHUBERT 1950, 1951; BLIX 1951; SHATTON und SCHUBERT 1954; DORFMAN und MATHEWS 1956; MEYER 1956; BERNARDI 1957; MUIR 1958). Mitunter wurde von salzartigen Bindungen gesprochen (MEYER und SMITH 1937; PARTRIDGE 1948, BLIX 1951; MEYER 1952, 1953; JORPES und YAMASHINA 1956). Jedoch ist der Ausdruck „salzartige Bindung“ nach LOEVEN (1955) nicht zu empfehlen, da er eine rein chemische Interpretation im Sinne der stöchiometrischen Bindung ausdrücken würde. Im Anschluß an Modellversuche hat LOEVEN die Schwellung des Knorpels in nativem Zustand und nach milder Extraktion der MPS untersucht. Er schließt aus seinen Versuchen, daß in der Verbindung des Protein-MPS-Komplexes ein kolloidales System im Sinne von BUNGENBERG DE JONG (1949) vorliegt. Der Auffassung von LOEVEN schließen sich PARTRIDGE und DAVIS (1958) mit der Begründung an, daß für die Bindung, den Aufbau der gelartigen Struktur usw. nicht nur Coulombkräfte verantwortlich gemacht werden könnten. Weiterhin glauben die Autoren, daß die Viskosität nicht auf der Bindung von Chondroitin-Schwefelsäure-Molekülen durch Proteine beruhe, sondern der Bildung von Makromolekülen, die aus kleineren Mucoprotein-Molekülen entstünden.

Auf das Vorhandensein weiterer Stoffe in der Interzellulärsubstanz, die keine MPS sind, wurde verschiedentlich hingewiesen (GLEGG u. Mitarb. 1954, 1955; SHETTLAR und MASTERS 1955; JOEL, MASTERS und SHETTLAR 1956; PARTRIDGE und DAVIS 1958). Hierbei handelt es sich zum Teil um neutrale Polysaccharide, zum Teil um noch unbekannte Stickstoffverbindungen, die nicht aus Aminosäuren aufgebaut sind.

Die komplexe Struktur der Interzellulärsubstanz läßt sich vielleicht auch an Hand der Extraktionsausbeute charakterisieren (vgl. ZACHARIAE und DYRBYE 1959). Die von MEYER (1938, 1945, 1956; vgl. STACEY 1946, BLIX 1951, MONTREUIL 1957) aufgeführten verschiedenen Formen der MPS wurden nach ihrem Verhalten gegenüber einer enzymatischen Hydrolyse und der optischen Aktivität unterschieden.

Jede *Extraktion* der MPS erfordert eine Zerstörung der Gewebestruktur (PARTRIDGE und DAVIS 1958). Die Löslichkeit der Interzellulärsubstanzen ist bei verschiedenen Arten der Stützgewebe unterschiedlich (MEYER bei HAMILTON 1952). Auch ist die Ausbeute je nach Extraktionsmitteln wechselnd (BLIX 1951, EINBINDER und SCHUBERT 1950, PARTRIDGE und DAVIS 1958). Die Extrakte besitzen voneinander abweichende Molekulargewichte und

Viskosität (JOPES und YAMASHINA 1956). Die ungleich große Extraktionsausbeute könnte für einen wechselnden Zustand der MPS sprechen, d. h. Änderungen in der morphologischen Beziehung zu anderen Gewebekomponenten, der physikalisch-chemischen Bindungsform usw. Leider wurden die einzelnen Abschnitte des Epiphysenknorpels im Hinblick auf Extraktionsmöglichkeit und Zusammensetzung der MPS bis heute nicht untersucht (vgl. SZIRMAI und DOYLE 1959).

Eine Zustandsänderung der Interfibrillärsubstanz im Sinne der *Depolymerisation* auf Grund des Ausfalles der PAS-Färbung nehmen z. B. GERSH und CATCHPOLE (1949) und GERSH (1949) an. Dieser Auffassung widersprachen McMANUS (1954) und DORFMANN (1955) wegen mangelnder Beweiskraft der histochemischen Methoden energisch. Auf der anderen Seite wurde neuerlich versucht, einen verschiedenen Polymerisationsgrad der organischen Interfibrillärsubstanz elektronenmikroskopisch nachzuweisen (ASADI u. Mitarb. 1956).

Die vorstehenden kurzen Hinweise über die Extraktionsausbeute mit den verschiedenen Lösungsmitteln, den Aufbau des MPS-Protein-Komplexes sowie das Vorhandensein neutraler Polysaccharide und anderer, noch unbekannter Substanzen lassen einen sehr komplexen Aufbau der organischen Interfibrillärsubstanz im Knorpel vermuten. Hypothesen über ihre Struktur wurden verschiedentlich geäußert (DORFMAN 1953, 1954, 1955; MATHEWS 1956; PARTRIDGE und DAVIS 1958). Hierbei wurde berücksichtigt, daß extrafibrilläre Kollagenmoleküle auftreten, daß die Chondroitin-Schwefelsäure sowohl frei als auch an Kollagenfasern gebunden ist (PARTRIDGE und DAVIS 1958). Die hohe negative Ladung der MPS soll die Affinität für Kationen und Wasser (GIBIAN 1954, DORFMAN 1955) erklären.

Die MPS sind keine vollständig definierbaren Verbindungen (GIBIAN 1954). Die biochemischen Untersuchungen zeigen damit eindeutig, daß mit „einer“ Substanz, die mittels einer Farbreaktion nachweisbar ist, in der organischen Interfibrillärsubstanz nicht gerechnet werden kann. Leider fehlen Angaben über die stoffliche Zusammensetzung der einzelnen Zonen des Epiphysenknorpels.

Unsere Ergebnisse über die *Anfärbbarkeit* der verschiedenen Anteile des Epiphysenknorpels sollen nun im Hinblick auf den Aufbau der organischen Interfibrillärsubstanz diskutiert werden. Wir haben sowohl Methoden zum Nachweis saurer MPS als auch von Polysacchariden mit entsprechenden fermentativen Kontrollen angewandt. Die Beurteilung der *Farbreaktionen* auf Kohlenhydrate und MPS ist ungewöhnlich schwierig. Hauptziel der vorausgegangenen Arbeiten war, eine spezifische Methode zum färberischen Nachweis von MPS bzw. Polysacchariden zu entwickeln. Als Testobjekt für MPS und Polysaccharide in situ wurde unter anderem der hyaline Epiphysenknorpel gewählt, um die Spezifität der Methode zu beurteilen. Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß zwar mit den angewandten Methoden mitunter ein Färbungsergebnis von gleichartiger Deutungsmöglichkeit zu erhalten ist. In anderen Fällen jedoch treten bei Anwendung verschiedener Methoden Differenzen in der Anfärbung der Teile des Epiphysenknorpels auf. Diese Unterschiede betreffen auch morphologisch voneinander abweichende Gebiete. Sie wurden von uns an Serienschnitten des gleichen Materials gewonnen, so daß anscheinend abweichende Ergebnisse nicht auf ungleichartige Vorbehandlung zu beziehen sind.

Für die Darstellung der organischen Interfibrillärsubstanz stehen zur Zeit 3 Methoden zur Verfügung: Die Prüfung der Basophilie mit fermentativer Kontrolle durch Vorbehandlung mit Hyaluronidase, der Nachweis durch sog. Polysaccharidreaktionen (PAS, kolloidale Eisenbindungen mit folgender Berliner Blau-

reaktion), sowie die metachromatische Farbreaktion. Wir haben die Metachromasie auch mit wäßriger Toluidinblaulösung von verschiedenem p_H geprüft.

Bedeutung und Wesen der *Metachromasie* wurden in der Literatur ausführlich diskutiert (u. a. LISON 1935, 1936; MICHAELIS 1947; WISLOCKI u. Mitarb. 1947; SYLVEN 1947, 1958; LILLIE 1950; McMANUS 1954; SCHEIBE und ZANKER 1958; BOOIJ 1958; SZIRMAI und BALAZS 1958; KELLY 1958; VITRY 1958). Eine metachromatische Färbung weist grundsätzlich nur auf elektronegative Gruppen in genügend geringem Abstand ($4-5 \text{ \AA}$) hin. Dabei kann es sich nicht nur um Sulfatgruppen, sondern auch um Metaphosphate, Phosphate und Carboxylgruppen handeln. Ein entscheidender Reaktionshemmer sind die Proteine. Da in der organischen Interfibrillärsubstanz neben freien Sulfo-MPS ein MPS-Protein-Komplex vorhanden ist, dürfte die metachromatische Farbreaktion durch das Protein entscheidend beeinflußt werden.

Im Hinblick auf die *Anfärbung der Interzellulärsubstanz* kamen wir zu folgenden Ergebnissen. Mit Methylenblau färbt sich die Interzellulärsubstanz im allgemeinen leicht metachromatisch. Die Zone des hyalinen Epiphysenknorpels tingiert sich in einem weiten p_H -Bereich annähernd gleichartig. Im Reihknorpel liegt das Maximum der Färbbarkeit zwischen 4,7 und 5,3, im hypertrophen Knorpel bei 5,3. Mit alkoholischer Toluidinblaulösung wird die metachromatische Reaktion der Interzellulärsubstanz zum hypertrophen Knorpel hin stärker. Durch wäßrige Toluidinblaulösung in verschiedenem p_H wird dagegen die Zone des Säulenknorpels mit stärkerer Reaktion gegenüber allen anderen hervorgehoben.

Eine starke PAS-positive Reaktion zeigt nur die Interzellulärsubstanz des hypertrophen Knorpels. Die Anwendung der Hale-Methode führt zu einer Blauschwarzfärbung im hyalinen Epiphysen- und Proliferationsknorpel, bei kleinen Rinderfeten unter 100 mm SSL weiterhin der Kapseln im Säulen- und hypertrophen Knorpel, bei größeren der gesamten Interfibrillärsubstanz. Die Abwandlungen der Hale-Methode von MÜLLER (1955/56), GRAUMANN (1958) und die vorherige Blockierung der α -Aminosäuren durch Ninhydrin (GEIER 1959) erlauben eine deutliche Unterscheidung zwischen den stark angefärbten Knorpelkapseln und der restlichen Interzellulärsubstanz.

Fast verwirrend wird das Färbungsmuster nach *enzymatischen Einwirkungen*. Nicht nur Hyaluronidase und Diastase, sondern auch Pepsin, Ribonuclease und Desoxyribonuclease (s. S. 246) rufen Färbungsänderungen hervor. Eine weitere Schwierigkeit taucht beim Vergleich der Färbungsergebnisse in verschiedenen Fetalstadien auf. *Lebensalterdifferenzen* äußern sich u. a. in der Aufnahme von S^{35} -Natriumsulfat (DZIEWIATKOWSKI 1954), in der biochemischen Zusammensetzung des Knorpels beim Hunde (EICHELBERGER u. Mitarb. 1958), einer Zunahme neutraler Polysaccharide (GLEGG u. Mitarb. 1954, 1955). Schließlich fallen bei gleichartiger Methode und gleich großen Feten mitunter Färbungsdifferenzen auf, die als Äquivalent einer rhythmischen Tätigkeit der Chondrocyten gedeutet werden könnten.

Bei Zusammenfassung der bisher bekannten Resultate einschließlich jenen der färberischen Untersuchungen scheint es uns zur Zeit nicht gerechtfertigt, bestimmte Aussagen über die stoffliche Zusammensetzung der Interfibrillärsubstanz bzw. deren Zustand in den einzelnen Zonen des Epiphysenknorpels zu machen.

Das unterschiedliche färberische Verhalten der Interzellulärsubstanz verschiedener Zonen des Epiphysenknorpels berechtigt aber zu der Annahme einer *Stoffproduktion durch die Chondrocyten*. Die Abgabe von Stoffen an die Interzellulärsubstanz ist durch autoradiographische Beobachtungen nachgewiesen. Hierbei kann es sich sowohl um MPS als auch um Proteine handeln (s. S. 241).

6. Die Stoffabgabe an die Interzellulärsubstanz durch Chondroblasten und Chondrocyten

Unsere Erörterungen beschäftigen sich mit der an Chondroblasten und Chondrocyten gebundenen Synthese des MPS-Protein-Komplexes sowie der vermutlich in den einzelnen Regionen des Epiphysenknorpels unterschiedlichen Zusammensetzung der Interzellulärsubstanz. Nunmehr ist zu prüfen, ob und welche Befunde für einen morphologisch nachweisbaren *Substanzübertritt* von der Zelle in die Interzellulärsubstanz sprechen.

Die elektronenmikroskopischen Befunde an den *Chondroblasten* machen wahrscheinlich, daß die Produktion der Interzellulärsubstanz und ihre Abgabe in den Interzellulärraum bis zu einem gewissen Umfang auch morphologisch faßbar ist. Dies gilt aber nicht für die Zellen des Epiphysenknorpels (s. unten).

Verschiedenartige Beobachtungen an Chondroblasten lassen einen Austritt der elektronenmikroskopisch strukturlos erscheinenden Zisternensubstanz zunächst in das Grundplasma und endgültig in den Interzellulärraum annehmen. Es ließ sich nämlich feststellen, daß unmittelbar neben scharf konturierten Membranen verwaschen erscheinende Zellmembranen und Membranen des endoplasmatischen Retikulums vorkommen; stellenweise sind überhaupt keine Membranen zu erkennen. Die Unterbrechung der scharfen Konturen von Zellmembranen z. B. bei Osteoblasten (KNESE und KNOOP 1958) und Chondroblasten (Abb. 4) könnte darauf beruhen, daß in diesem Bereich eine Eröffnung der Zellmembranen erfolgte. In vielen Fällen freilich dürfte das Bild der verwaschenen Membran durch Tangentialschnitt des Plasmalemmas zustande kommen. Die Möglichkeit der Entstehung von Artefakten, etwa in nächster Nachbarschaft interzellulär gelegener Fibrillen, ist nicht von der Hand zu weisen. Weitere Untersuchungen sind notwendig.

Eine *Änderung der Membranstruktur* des Bürstensaumes im Jejunum bei Resorption beschrieben SJÖSTRAND und ZETTERQVIST (1956) nach Verfütterung von KH, Proteinen bzw. Fett. Daher darf man wohl auch an die Möglichkeit einer Änderung der Membranstruktur bei einer „Sekretion“ denken, vor allem einer massiven Bildung extrazellulärer Substanzen. Im Interzellulärraum liegen den Chondroblasten bei Fehlen einer Zellmembran stets größere Mengen dicht gelagerter Kollagenfibrillen und damit wohl auch MPS an (vgl. MPS und Fibrillogenese: COHEN 1942, PARTRIDGE 1948, WASSERMANN 1956).

Bei Beurteilung der Ausschüttung von Material aus der Zelle muß man den Zustand dieses Materials berücksichtigen. Das Molekulargewicht der Chondroitin-Schwefelsäure des Knorpels wird mit 260000 (BLIX und SNELLMANN 1945), 43000 (MATHEWS und DORFMAN 1953), für einen Chondroitin-Schwefelsäure-Protein-Komplex mit 30% Protein zu 1×10^6 (MATHEWS 1955) bzw. $5-25 \times 10^6$ (MATHEWS 1956) angegeben. Die Bestimmung des Molekulargewichtes durch Diffusion oder Zentrifugieren ist bei Vorhandensein elektrischer Ladungen ungewöhnlich schwierig (JOPES und YAMASHINA 1956). Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß die MPS polydispers, d. h. von wechselnder Molekülgröße sind. Die Kettenlänge der Fasermoleküle kann bis zu 4700 Å (MEYER u. Mitarb. 1948) bzw. 3800 (MATHEWS 1956)

betragen (vgl. weiter DOREMAN 1954, BERNARDI u. Mitarb. 1957). Auf die Relation zwischen Molekülgröße und Durchwanderungsmöglichkeit haben PAULSON u. Mitarb. (1951) beim Nucleus pulposus hingewiesen. Die Spaltenweite im Nucleus pulposus von 15 Å im Mittel ermöglicht den Durchtritt einfacher Zucker und Aminosäuren, aber nicht von größeren Molekülen.

Wenn die Sulfatveresterung in einem hohen Polymerisationsgrad angenommen wird (MEYER 1956, RODEN 1956) und die S^{35} -Einlagerung bereits in der Zelle zu beobachten ist (BÉLANGER 1954, AMPRINO 1955, VERNE u. Mitarb. 1956), müssen die aus der Zelle auszuschleusenden MPS eine erhebliche Größe erreicht haben. Hochpolymere Substanzen können aber vermutlich nur nach Veränderung bzw. Auflösung des Plasmalemmes aus der Zelle austreten.

Morphologische Zeichen, die auf eine *Stoffabgabe seitens der Chondrocyten* an die Interzellulärsubstanz hinweisen, konnten jedoch nicht beobachtet werden. Eine Stoffproduktion durch die Zellen des Epiphysenknorpels machen aber autoradiographische und histochemische Untersuchungen der Interzellulärsubstanz wahrscheinlich.

Die vorgelegten Beobachtungen sprechen dafür, daß die *sackartig erweiterten Zisternen des endoplasmatischen Retikulums das Äquivalent für die Bildung des MPS-Protein-Komplexes* darstellen. Das Auftreten der erweiterten Zisternen in den Chondroblasten verhält sich spiegelbildlich zum Erscheinen der metachromatischen Farbreaktion der Interzellulärsubstanz des Knorpels und der S^{35} -Ablagerungen. Die Zisternenaufreibungen der Chondrocyten lassen eine Stoffproduktion vermuten, die den Zustand der Interzellulärsubstanz verändert. In den Chondrocyten sind färberisch Granula darzustellen, deren Verhalten gegenüber enzymatischer Hydrolyse auf das Vorhandensein von MPS hinweist. Auch zeigt der Inhalt der Zisternen eine elektronenoptisch nachweisbare Veränderung durch Fermenteinwirkung. Die Zustandsänderung der Interzellulärsubstanz findet ihren Ausdruck im färberischen Verhalten. Allerdings lassen unsere biochemischen Kenntnisse über den Aufbau der Interzellulärsubstanz keine Aussagen über den Charakter oder Zustand der Interzellulärsubstanz in den einzelnen Abschnitten des Epiphysenknorpels zu.

Zusammenfassung

Elektronenmikroskopische und histochemische Untersuchungen über die Knorpel- bzw. Knochenbildung unter besonderer Berücksichtigung der MPS-Synthese werden vorgelegt. Elektronenmikroskopisch haben wir die Tibia von Rattenfeten nach Osmium- und Formalinfixierung sowie Methacrylateinbettung, vergleichsweise auch Vestopal, untersucht. Die histochemischen Befunde wurden am Metacarpus von Rinderfeten unter entsprechender Kontrolle an Rattenfeten erhoben. Folgende Befunde wurden gewonnen:

1. Die Chondroblasten zeigen ähnlich wie die Osteoblasten sackartige Erweiterungen bis auf 3000—4000 Å der Zisternen des endoplasmatischen Retikulums. Die Zisternen sind mit einer homogen erscheinenden Substanz erfüllt. Nach Hyaluronidase- und Diastaseeinwirkung bietet der Zisterneninhalt das Bild unregelmäßiger Schollen. Die Zisternenerweiterungen verschwinden in der Knorpelbildungsfront bei Auftreten der Interzellulärsubstanz des Knorpels, die eine metachromatische Farbreaktion gibt. Es wird erörtert, ob Veränderungen der Zellmembran und der Membranen des endoplasmatischen Retikulums als Zeichen der

Materialabgabe aus Chondroblasten in den Interzellularraum angesehen werden können.

2. Bei dem Gestaltwandel der Knorpelzellen in den einzelnen Zonen des Epiphysenknorpels (Appositionszone, hyaliner Epiphysenknorpel, Proliferations-, Säulen- und hypertropher Knorpel) erscheinen wiederum Zisternenerweiterungen von 10000—48000 Å Durchmesser. Der Übertritt des Zisternenmaterials in das Hyaloplasma der hypertrophen Knorpelzellen ist zwar zu vermuten, aber elektronenmikroskopisch nicht nachweisbar.

3. In den Knorpelzellen lassen sich mit Toluidinblau bei saurem pH sowie mit Methoden zum KH-Nachweis Granula darstellen, die der Größe nach, 1—5 μ , den Zisternenerweiterungen entsprechen. Die hypertrophen Knorpelzellen weisen dagegen eine diffuse Metachromasie ihres Cytoplasmas auf.

4. Das Verhalten der Interzellulärsubstanz in den Zonen des Epiphysenknorpels gegenüber einer Reihe von Färbemethoden zum Nachweis von MPS und KH wird beschrieben, ebenso deren Basophilie. Die verschiedenartige Reaktion der Interzellulärsubstanz in den einzelnen Zonen wird im Einklang mit autoradiographischen Untersuchungen anderer Autoren als Zeichen für eine Stoffproduktion gedeutet.

5. Die in der Literatur mitgeteilten Befunde über Struktur und Bildung der Interzellulärsubstanz, speziell der Mucopolysaccharide, werden zum Vergleich herangezogen. Diese Angaben lassen einen sehr verwickelten Aufbau der Interzellulärsubstanz vermuten. Das färberische Verhalten der Interzellulärsubstanz läßt zwar Differenzen zwischen den einzelnen Zonen des Epiphysenknorpels erkennen, doch gestatten die Färbemethoden keine zuverlässigen Aussagen über einen unterschiedlichen stofflichen Aufbau.

Literatur

- ALBAUM, H.-G., A. HIRSHFELD and A. E. SOBEL: Calcification. VIII. Glycolytic enzymes and phosphorylated intermediates in pre-osseous cartilage. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **79**, 682—686 (1952).
- AMPRINO, R.: Autoradiographic research on the S^{35} -sulphate metabolism in cartilage and bone differentiation and growth. *Acta anat. (Basel)* **24**, 121—163 (1953).
- Distribution of S^{35} sodium sulfate in early chick embryos. *Experientia (Basel)* **11**, 1—6 (1955).
- Uptake of S^{35} in the differentiation and growth of cartilage and bone, p. 89—102. In *Ciba Found. Symposium on bone structure and metabolism*. London: J. & A. Churchill 1956.
- ASADI, A. M., T. F. DOUGHERTY and G. W. COCHRAN: An electron microscopic study of the ground substance of connective tissue. *Nature (Lond.)* **178**, 1061—1062 (1956).
- ASCENZI, A., and E. L. BENEDETTI: An electron microscopic study of the foetal membranous ossification. *Acta anat. (Basel)* **37**, 370—385 (1959).
- BAZIN, S., et A. DELAUNAY: Le métabolisme des mucopolysaccharides. *Biol. méd. (Paris)* **48**, 351—441 (1959).
- BÉLANGER, L. F.: Autoradiographic visualization of in vitro exchange in teeth, bones, and other tissues, under various conditions. *J. dent. Res.* **32**, 168—176 (1953).
- Autoradiographic visualization of the entry and transit of S^{35} in cartilage, bone, and dentine of young rats and the effect of hyaluronidase in vitro. *Canad. J. Biochem.* **32**, 161—169 (1954).
- Autoradiographic detection of radiosulfate incorporation by the growing enamel of rats and hamsters. *J. dent. Res.* **34**, 20—27 (1955).
- Autoradiographic visualization of the entry and transit of S^{35} methionine and cystine in the soft and hard tissues of the growing rat. *Anat. Rec.* **124**, 555—580 (1956).

- BENDITT, E. P., and J. E. FRENCH: Histochemistry of connective tissues. I. The use of enzymes as specific histochemical reagents. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 315—320 (1953).
- BERENSON, G. S., W. M. LUMPKIN and V. G. SHIPP: Study of the time-course production of acid mucopolysaccharides by fibroblasts in a synthetic medium. *Anat. Rec.* **132**, 585—596 (1958).
- BERNARDI, G.: The molecular size, shape and weight of mucoprotein from cartilage. *Biochim. biophys. Acta* **26**, 47—52 (1957).
- F. HAPPEY and A. NAYLOR: Mucopolysaccharides from cartilage and nucleus pulposus. *Nature Lond.* **180**, 1341—1342 (1957).
- BLIX, G.: Glykoproteide. *Physiologische Chemie I*, herausgeg. v. B. FLASCHENTRÄGER u. E. LEHNARTZ, S. 751—767. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1951.
- , and O. SNELLMANN: On chondroitin sulphuric acid and hyaluronic acid. *Ark. Kemi, Mineral. Geol.* **19a**, 1—19 (1945).
- BOOIJ, H. L.: Colloid chemical aspects of metachromasia. *Acta histochem. (Jena) Suppl.* **1**, 37—55 (1958).
- BOSTRÖM, H., and S. AQVIST: Utilization of S³⁵ labelled sodium sulphate in the synthesis of chondroitin sulphuric acid, taurine, methionine and cystine. *Acta chem. scand.* **6**, 1557—1559 (1952).
- , and E. JORPES: On the enzymatic exchange of the sulphate group of the animal sulphomucopolysaccharides. *Experientia (Basel)* **10**, 392—396 (1954).
- , and B. MANSSON: On the enzymatic exchange of the sulfate group of chondroitinsulfuric acid in slices of cartilage. *J. biol. Chem.* **196**, 483—487 (1952).
- — Factors influencing the exchange of the sulphate group of the chondroitin sulphuric acid of cartilage in vitro. *Ark. Kemi., Mineral. Geol.* **6**, 23—37 (1953).
- U. FRIBERG, E. ODEBLAD and N. RINGERTZ: Uptake of labelled sulphate by experimental skin tumours in the rat and the mouse. *Acta path. microbiol. scand.* **35**, 1—7 (1954).
- , and E. ODEBLAD: An autoradiographic study on the occurrence of injected radiosulphate in the intestine. *Acta physiol. scand.* **32**, 124—128 (1954).
- BUNGENBERG DE YONG, H. G.: Complex colloid systems. In H. R. KRUYT, *Colloid Science II*. Amsterdam: Elsevier Publ. Co. 1949.
- BYWATERS, E. G. L.: The metabolism of joint tissues. *J. Path. Bact.* **44**, 247—268 (1937).
- CAMERON, D. A., and R. A. ROBINSON: Electron microscopy of epiphyseal and articular cartilage matrix in the femur of the newborn infant. *J. Bone Surg. A* **40**, 163—170 (1958).
- CASSELMAN, B.: Histochemical technique. London: Methuen & Co. 1959.
- CEDERGREN, B., and T. HOLME: On the glycogen in *Escherichia coli* B.: Electron microscopy of ultra thin sections of cells. *J. ultrastruct. Res.* **3**, 70—73 (1959).
- COHEN, S. S.: The isolation and crystallization of plant viruses and other protein and macromolecules by means of hydrophilic colloids. *J. biol. Chem.* **144**, 353—362 (1942).
- CONSDEN, R., and A. BIRD: Carbohydrate of connective tissue. *Nature (Lond.)* **173**, 996—997 (1954).
- CURRAN, R. C.: Observations on the formation of collagen in quartz lesions. *J. Path. Bact.* **66**, 271—282 (1953).
- DELAUNAY, A., et S. BAZIN: Métabolisme des mucopolysaccharides. *Ann. Histochem.* **4**, 259—278 (1958).
- DEMPSEY, E. W., and R. R. PETERSON: Electron microscopic observations on the thyroid glands of normal, hypophysectomized, cold exposed and thiouracil-treated rats. *Endocrinology* **56**, 46—58 (1955).
- DORFMAN, A.: The effects of adrenal hormones on connective tissues. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **56**, 698—703 (1953).
- Metabolism of the mucopolysaccharides of connective tissue. *Connective Tissue in Health and Disease*, ed. Asboe-Hansen. Copenhagen 1954.
- Metabolism of the mucopolysaccharides of connective tissue. *Pharmacol. Rev.* **78**, 1—31 (1955/56).
- , and J. A. CIFONELLI: Biosynthesis of mucopolysaccharides: The undine nucleotides of group a streptococci. In: *Chemistry and biology of mucopolysaccharides*. Ciba Foundation Symp. London 1956.
- , and M. B. MATHEWS: The physiology of connective tissue. *Ann. Rev. Physiol.* **18**, 69—88 (1956).

- DUJN, P. VAN: A histochemical specific thionine- SO_2 reagent and its use in a bicolor method for desoxyribonucleic acid and periodic acid Schiff positive substances. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 55—63 (1954).
- DURNING, W. C.: Submicroscopic structure of frozendried epiphyseal plate and adjacent spongiosa of the rat. *J. ultrastruct. Res.* **2**, 245—260 (1958).
- DZIEWIATKOWSKI, D. D.: Isolation of chondroitin sulfate S^{35} from articular cartilage of rats. *Z. biol. Chem.* **189**, 187—190 (1951).
- Radioautographic visualization of sulfur-35 disposition in the articular cartilage and bone of suckling rats following injection of labeled sodium. *J. exp. Med.* **93**, 451—458 (1951).
- Effect of age on some aspects of sulfate metabolism in the rat. *J. exp. Med.* **99**, 283—298 (1954).
- Autoradiographic studies with S^{35} -sulfate. *Rev. Cytol.* **7**, 159—194 (1958).
- EEG-LARSEN, N.: An experimental study on growth and glycolysis in the epiphyseal cartilage of rats. *Acta physiol. scand.* **38**, 128, 1—77 (1956).
- EICHELBERGER, L. W., H. AKESON and M. ROMA: Biochemical studies of articular cartilage. I. Normal values. *J. Bone Jt Surg. A* **40**, 142—152 (1958).
- T. D. BROWER and M. ROMA: Histochemical characterization of inorganic constituents, connective tissue and the chondroitin sulfate of extracellular and intracellular compartments of hyaline cartilages. *Amer. J. Physiol.* **166**, 328—339 (1951).
- EINBINDER, J., and M. SCHUBERT: Separation of chondroitin sulfate from cartilage. *J. biol. Chem.* **185**, 725—730 (1950).
- Binding of mucopolysaccharides and dye by collagen. *J. biol. Chem.* **188**, 335—341 (1951).
- ENGELDT, B., A. ENGSTRÖM and H. BOSTRÖM: The localization of radiosulfate in bone tissue. *Exp. Cell. Res.* **6**, 251—253 (1954).
- FOLLIS jr., R. H.: Inorganic composition and phosphatase activity of human cartilage in relation to morphological differentiation. *Fed. Proc.* **8**, 355 (1949).
- Cartilage and bone matrix: chemical structure, formation and destruction. *Trans. Conf. Metabol. Interrelat.*, **4**, Conf., p. 11—31, 1952.
- , and M. BERTHRONG: Histochemical studies on cartilage and bone. I. The normal pattern. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **85**, 281—297 (1949).
- FRENCH, J. E., and E. P. BENDITT: The histochemistry of connective tissue. II. The effect of proteins on the selective staining of mucopolysaccharides by basic dyes. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 311—325 (1953).
- FRIBERG, U.: Uptake of radiosulfate und radiophosphate in various tissues of normal and vitamin C-deficient guinea pigs. *Ark. Kemi* **12**, 481—500 (1958).
- GENDRE, H.: Le glycogène dans les cartilages en voie d'ossification. *Bull. Histol. appl.* **15**, 165—178 (1938).
- GERSH, I.: Ground substance and the plasticity of connective tissues. *Harvey Lect.* **45**, 211—241 (1949/50).
- GERSH, I., and H. R. CATCHPOLE: The organization of ground substance and basement membrane and its significance in tissue injury, disease and growth. *Amer. J. Anat.* **85**, 457—521 (1949).
- GEYER, G.: Ninhydrinblockierungsreaktion. *Mitt. auf d. Symposion für Histochemie 1959* Kiel.
- GIBIAN, H.: Der Beitrag des Chemikers zur Struktur- und Funktionsaufklärung der mesenchymalen Grundsubstanz mit besonderer Bezugnahme auf die Hyaluronidase und ihre Substrate. In: *Kapillaren und Interstitium*. Stuttgart: Georg Thieme 1953.
- Das Hyaluronsäure-Hyaluronidase-System. *Ergebn. Enzymforsch.* **8**, 1—84 (1954).
- GIESEKING, R.: Über die faserige Differenzierung des Mesenchyms in frühen Stadien der Entwicklung. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, **43**, Tagg. S. 56—61, 1959.
- Elektronenoptische Beobachtungen an Fibroblasten. *Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes*, S. 131—150. Herausgeg. von W. H. HAUSS u. H. LOOSE. Stuttgart: Georg Thieme 1960.
- GLEGG, R. E., D. EIDINGER and C. P. LEBLOND: Presence of carbohydrates distinct from acid mucopolysaccharides in connective tissue. *Science* **120**, 839—840 (1954).
- , and V. EIDINGER: A method for fractionating the carbohydrate components of bone. *Arch. Biochem.* **55**, 19—24 (1955).

- GLOCK, G. E.: Glycogen and calcification. *J. Physiol. (Lond.)* **98**, 1—11 (1940).
- GRAUMANN, W.: Weitere Untersuchungen zur Spezifität der histochemischen Polysaccharid-Eisenreaktion. *Acta histochem. (Jena)* **6**, 1—7 (1958).
- GREILING, H., u. W. BANDITZ: Enzymatische Veresterung von Chondroitin mit Sulfat durch ein Ferment aus Rattenleber. *Naturwissenschaften* **46**, 355—356 (1959).
- GREULICH, R. C.: Effect of metachromatic staining on S^{35} content of condroitin sulfate. Autoradiographic observations. *Anat. Rec.* **125**, 577 (1956).
- , and C. P. LEBLOND: Radioautographic visualization of radiocarbon in the organs and tissues of newborn rats following administration of C^{14} -labelled bicarbonate. *Anat. Rec.* **115**, 559—585 (1953).
- GROSSFELD, H., K. MEYER and G. GODMAN: Differentiation of fibroblasts in tissue culture as determined by mucopolysaccharide production. *Proc. Soc. exp. Biol.* **88**, 31 (1955).
- — Acid mucopolysaccharides produced in tissue culture. *Anat. Rec.* **124**, 489 (1956).
- — — et A. LINKER: Mucopolysaccharides in tissue culture. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 391—396 (1957).
- GUTMAN, A. B.: Relation of phosphorylase and phosphatase to calcification in cartilage. *Trans. Conf. metabol. Aspects Convalescence* **14**, 20—24 (1946).
- , and E. B. GUTMAN: A phosphorylase in calcifying cartilage. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **48**, 687—691 (1941).
- , and T. F. YÜ: Further studies of the relation between glycogenolysis and calcification in cartilage. *Trans. Conf. Metabol. Interrelat.*, 1. Conf., p. 11—26, 1949.
- — A concept of the role of enzymes in endochondral calcification. *Trans. Conf. Metabol. Interrelat.*, 2. Conf., p. 167—190, 1950.
- HAGUENAU, F.: The ergastoplasm. *Rev. Cytol.* **7**, 425—484 (1958).
- HAMILTON, P. B.: Studies on the nature of the protein components of bone. *Metab. Inter.* **4**, 59—62 (1952).
- HARRIS, H. A.: Glycogen in bone cartilage. *Nature (Lond.)* **130**, 996—997 (1932).
- Bone growth in health and disease; the biological principles underlying the clinical, radiological and histological diagnosis of perversions of growth and disease in the skeleton. London: Oxford University Press 1933.
- HELLER-STEINBERG, M.: Ground substance, bone salts, and cellular activity in bone formation and destruction. *Amer. J. Anat.* **89**, 347—379 (1951).
- HENDLER, R. W., A. J. DALTON and G. G. GLENNER: A cytological study of the albumin-secreting cells of the hen oviduct. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 325—330 (1957).
- JACKSON, S. F., and I. T. RANDALL: Fibrogenesis and the formation of matrix in developing bone. In: Ciba Found. Symposium on bone structure and metabolism, p. 47—64. London: Churchill 1956.
- JOEL, W., Y. F. MASTERS and M. R. SHETLAR: Comparison of histochemical and biochemical methods for the polysaccharides of cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 476—478 (1956).
- KARRER, H. E.: Electron-microscopic observations on developing chick embryo liver. The Golgi complex and its possible role in the formation of glycogen. *J. ultrastruct. Res.* **4**, 149—165 (1960a).
- Electron-microscopic study of glycogen in chick embryo liver. *J. ultrastruct. Res.* **4**, 191—212 (1960b).
- JORGES, E., u. I. YAMASHINA: Die Mucopolysaccharide und Glykoproteide des Bindegewebes. 7. Colloquium der Ges. für Physiol. Chemie, S. 25—42. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.
- KASSOWITZ, M.: Die normale Ossifikation und die Erkrankung des Knochensystems bei Rachitis und hereditärer Syphilis. *Med. Jb.* **1879**, 145—223, 293—457; **1881**, 315—466.
- KELLY, J. W.: The use of metachromasy in histology, cytology and histochemistry. *Acta histochem. (Jena) Suppl.* **1**, 85—102 (1958).
- KLING, D. H., and G. CAMERON: Morphological and physiological study of tissue cultures of human and mammalian synovial membranes. *Anat. Rec.* **121**, 472 (1955).
- KNESE, K.-H.: Die diaphysäre chondrale Osteogenese bis zur Geburt. *Z. Zellforsch.* **47**, 80—113 (1957).
- Neuere Untersuchungen über die Knochenbildung und ihre Beeinflussungsmöglichkeiten. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **14/15**, 925—932, 990—1000 (1959).
- , u. A. M. KNOOP: Elektronenoptische Untersuchungen über die periostale Osteogenese. *Z. Zellforsch.* **48**, 455—478 (1958).

- KRAMER, H., and G. M. WINDRUM: The metachromatic staining reaction. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 227—237 (1955).
- LEYNSE, B.: Investigations on the glycolytic enzyme system of calcifying bones. *Acta physiol. pharmacol. neerl.* **2**, 442—445 (1951/52).
- LILLIE, R. D.: Further exploration of the HIO_4 -Scheiff reaction with remarks on its significance. *Anat. Rec.* **108**, 239—253 (1950).
- LISON, L.: Etudes sur la métacromasie; colorants métacromatiques et substances chromotropes. *Arch. Biol. (Liege)* **46**, 599—668 (1935).
- *Histochimie animale*. Paris: Gauthier-Villars 1936.
- LOEVEN, W. A.: The binding collagen-mucopolysaccharide in connective tissue. *Acta anat.* **24**, 217—244 (1955).
- LUTWAK-MANN, C.: Enzyme systems in articular cartilage. *Biochem. J.* **34**, 517—527 (1940).
- MANCINI, R. E., and E. S. DE LUSTIG: Accion de la desoxicorticosterona y cortisona sobre las mucoproteinas de los fibroblastos in vitro. *Rev. Soc. argent. Biol.* **27**, 86—94 (1951).
- — and C. NUNEZ: Radiosulfur intake by mucopolysaccharides of embryonic and cultured connective tissues. *Anat. Rec.* **124**, 493—494 (1956).
- MARTIN, A. V. W.: Fine structure of cartilage matrix. Nature and structure of collagen, edit. J. T. Randall. London: Butterworth & Co. 1953.
- An electron microscope study of the cartilaginous matrix in the developing tibia of the fowl. *J. Embryol. exp. Morph.* **2**, 38—48 (1954).
- MATHEWS, M. B.: Light scattering investigation of chondroitin sulfuric acid preparations. *Fed. Proc.* **14**, 252 (1955).
- Interactions of mucopolysaccharides and some protein components of connective tissue. *Circulation* **14**, 972—973 (1956).
- , and A. DORFMAN: The molecular weight and viscosimetry of chondroitin-sulfuric acid. *Arch. Biochem.* **42**, 41—53 (1953).
- MCMANUS, J. F. A.: Histochemistry of connective tissue. In: *Connective tissue in health and disease*, edit. Asboe-Hansen. Copenhagen: Munksgard 1954.
- MEYER, K.: The chemistry and biology of mucopolysaccharides and glycoproteins. *Symp. Quant. Biol.* **6**, 91—102 (1938).
- Mucoids and glycoproteins. *Advance. Protein Chem.* **2**, 249—273 (1945).
- MICHAELIS, I.: The nature of the interaction of nucleic acids and nuclei with basis dyestuffs. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **12**, 131—142 (1947).
- MIYAZAKI, T.: Biochemical studies on carbohydrates. VI. Determination of chondroitin-sulfuric acid in cartilage and bone. *J. Biochem. (Tokyo)* **20**, 223—231 (1934).
- MOORE, R. D., and M. D. SHOENBERG: Studies on connective tissue. I. The polysaccharides of umbilical cord. *Arch. Path. (Chicago)* **64**, 39—45 (1957).
- MÜLLER, G.: Über eine Vereinfachung der Reaktion nach HALE 1946. *Acta histochem. (Jena)* **2**, 68—70 (1955/56).
- Die Darstellung saurer Mucopolysaccharide durch die Toluidinblau-Metachromasie, die Alcianblaufärbung, die PAS-Reaktion und die Ferrihydroxydsol-PAS-Reaktion. *Acta histochem. (Jena)* **6**, 218—224 (1959).
- MÜLLER, H.: Über die Entwicklung der Knochensubstanz nebst Bemerkungen über den Bau rachitischer Knochen. *Z. Zool.* **9**, 147—233 (1858).
- MUIR, H. P.: The nature of the link between protein and carbohydrate of a chondroitin sulphate complex from hyaline cartilage. *Biochem. J.* **69**, 195—204 (1958).
- NIKLAS, A., u. W. OEHLERT: Autoradiographische Untersuchung der Größe des Eiweißstoffwechsels verschiedener Organe, Gewebe und Zellarten. *Beitr. path. Anat.* **116**, 92—123 (1956).
- OBERLING, CH.: The structure of cytoplasm. *Rev. Cytol.* **8**, 1—32 (1959).
- PALADE, G. E.: The endoplasmic reticulum. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, 85—97 (1956).
- , and K. R. PORTER: Studies on the endoplasmic reticulum. I. Yts identification in cells in situ. *J. exp. Med.* **100**, 641—656 (1954).
- PARTRIDGE, S. M.: The chemistry of connective tissues. I. The state of combination of chondroitin sulphate in cartilage. *Biochem. J.* **43**, 387—397 (1948).
- , and H. F. DAVIS: The chemistry of connective tissues. IV. The presence of a non-collagenous protein in cartilage. *Biochem. J.* **68**, 298—305 (1958).

- PAULSON, S., B. SYLVÉN, C. HIRSCH and O. SNELLMAN: Biophysical and physiological investigations on cartilage and other mesenchymal tissues. III. The diffusion rate of various substances in normal bovine nucleus pulposus. *Biochem. biophys. Acta* **7**, 207—213 (1951).
- PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry*. London: Churchill 1953.
- PELC, S. R., and A. GLUCKSMANN: Sulphate metabolism in the cartilage of the trachea, pinna and xiphoid process of the adult mouse as indicated by autoradiographs. *Exp. Cell Res.* **8**, 336—344 (1955).
- PETERSEN, H.: *Histologie und mikroskopische Anatomie*. München: J. F. Bergmann 1935.
- PORTER, K. R.: Observations on a submicroscopic basophilic component of cytoplasm. *J. exp. Med.* **97**, 727—750 (1953).
- Electron microscopy of basophilic components of cytoplasm. *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 346—355 (1954).
- PRITSCHARD, J. J.: A cytological and histochemical study of bone and cartilage formation in the rat. *J. Anat. (Lond.)* **86**, 259—277 (1952).
- PUTSCHAR, W. G.: General pathology of the musculo-skeletal system. *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. III/2, S. 364—488. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- ROBBINS, P. W., and F. LIPMANN: Identification of enzymatically active sulfate as adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate. *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 2652—2653 (1956).
- Separation of the two enzymatic phases in active sulfate synthesis. *J. biol. Chem.* **233**, 681—685 (1958).
- Enzymatic synthesis of adenosine-5'-phosphosulfate. *J. biol. Chem.* **233**, 686—690 (1958).
- ROBISON, R.: The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* **17**, 286—293 (1923).
- , and A. H. ROSENHEIM: Calcification of hypertrophic cartilage in vitro. *Biochem. J.* **28**, 684—698 (1934).
- RODÉN, L.: Effect of glutamine on the synthesis of chondroitin sulphuric acid in vitro. *Arch. Kemi* **10**, 333—344 (1956).
- ROMEIS, B.: *Histologische Technik*. München: Leibnitz-Verlag 1948.
- SCHAFER, Z.: Die Stützgewebe. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. II/2, S. 1—390. 1930.
- SCHEIBE, G., u. V. ZANKER: Physikochemische Grundlagen der Metachromasie. *Acta histochem. (Jena) Suppl.* **1**, 1—37 (1958).
- SCHIEBLER, T. H.: Darstellung von B-Zellen in Pankreasinseln und von Neurosekret mit Pseudoisocyanin. *Naturwissenschaften* **45**, 214 (1958).
- SCHOENBERG, M. D., et R. D. MOORE: Studies on connective tissue. II. Histochemical differences in the connective tissue polysaccharides of the mature and immature human umbilical cord. *Arch. Path. (Chicago)* **64**, 167—170 (1957).
- Studies on connective tissue. III. Enzymatic studies on the formation and nature of the carbohydrate intermediate of the connective tissue polysaccharides in the human umbilical cord. *Arch. Path. (Chicago)* **65**, 115—124 (1958).
- SCOTT, B. L., and D. PEASE: Electron microscopy of the epiphyseal apparatus. *Anat. Rec.* **126**, 465—495 (1956).
- SHATTON, J., and M. SHUBERT: Isolation of a mucoprotein from cartilage. *J. biol. Chem.* **211**, 565—573 (1954).
- SHELDEN, H., and R. ROBINSON: Studies on cartilage: electron microscope observations on normal rabbit ear cartilage. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 401—406 (1958).
- SHETLAR, M. R., and Y. F. MASTERS: Effect of age on polysaccharide composition of cartilage. *Proc. exp. Biol. (N.Y.)* **90**, 31—33 (1955).
- SJÖSTRAND, F. S.: The ultrastructure of cells as revealed by the electron microscope. *Int. Rev. Cytol.* **5**, 456—533 (1956).
- , and H. ZETTERQVIST: Functional changes of the free cell surface membrane of the intestinal absorbing cell. *Electron Microscopy. Proc. of the Stockholm Conf., Sept. 1956*, edit. F. S. Sjöstrand and J. J. Rhodin, p. 150—151. Stockholm: Almqvist & Wiksell 1957.
- STACEY, M.: The chemistry of mucopolysaccharides and mucoproteins. *Advanc. Carbohydr. Chem.* **2**, 161—201 (1946).

- SYLVÉN, B.: Cartilage and chondroitin sulphate. I. The physiological role of chondroitin sulphate in cartilage. *J. Bone Jt Surg.* **29**, 745—752 (1947).
- Cartilage and chondroitin sulphate. II. Chondroitin sulphate and the physiological ossification of cartilage. *J. Bone Jt Surg.* **29**, 973—976 (1947).
- On the interaction between metachromatic dyes and various substrates of biological interest. *Acta histochem. Suppl.* **1**, 79—85 (1958).
- SZIRMAI, J. A., and E. A. BALAZIS: Metachromasia and the quantitative determination of dyebinding. *Acta histochem. (Jena) Suppl.* **1**, 56—79 (1958).
- and J. DOYLE: The distribution of polysaccharides in hyaline cartilage. *Biochem. J.* **73**, 35P (1959).
- TAKEUCHI, T.: Histochemical demonstration of branching enzyme in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 208—216 (1958).
- TAKUMA, S.: Electron microscopy of the developing cartilagenous epiphysis. *Arch. oral Biol.* **2**, 111—119 (1960).
- TAYLOR, H. E., and A. M. SOUNDERS: The association of granulation tissue ground substance with fibroblastic activity. *Amer. J. Path.* **32**, 617 (1956).
- THEMANN, H.: Elektronenmikroskopische Darstellung von Glykogen. *Naturwissenschaften* **47**, 155 (1960).
- TONNA, E. A., and E. P. CRONKITE: Histochemical and autoradiographic studies on the effects of aging on the mukopolysaccharides of the periosteum. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 171—178 (1959).
- VERNE, J., J. BESCOL-LIVERSAC, B. DROZ et L. OLIVIER: Aspects de la fixation du ^{35}S dans les cartilages. Corrélations histophysiologiques. *Ann. Histochim.* **1**, 191—198 (1956).
- VITRY, G.: La reaction metachromatique et son utilisation pour l'étude des polysaccharides. *Ann. Histochim.* **4**, 277—307 (1958).
- WASSERMANN, F.: The intercellular components of connective tissue: origin, structure and interrelationship of fibers and ground substance. *Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch.* **35**, 239—333 (1956).
- WATANABE, J.: A study of the intracytoplasmic sacs in exocrine pancreatic cells and in myeloid cells. *J. Elektronmiesk.* **3**, 43—50 (1955).
- WEISS, H.: Rapporti tra mucopolisaccaridi acidi e atrocirosi. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **34**, 785—786 (1958).
- Effetto antidiffusore dell'acido ialuronico. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **34**, 1668—1671 (1958).
- WEISSMANN, B., and K. MEYER: Observations on the mechanism of action of mammalian hyaluronidase. *Fed. Proc.* **12**, 287—288 (1953).
- — P. SAMPSON and A. LINKER: Isolation of oligosaccharides enzymatically produced from hyaluronic acid. *J. biol. Chem.* **208**, 417—429 (1954).
- WISLOCKI, G. B., H. BUNTING and E. W. DEMPSEY: Metachromasia in mammalian tissues and its relationship to mucopolysaccharides. *Amer. J. Anat.* **89**, 1—37 (1947).
- WISSIG, St. L.: The anatomy of secretion in the follicular cells of the thyroid gland. I. The fine structure of the gland in the normal rat. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 419—432 (1960).
- WOODIN, A. M.: The corneal mucopolysaccharide. *Biochem. J.* **51**, 319—330 (1952).
- YIEDLING, K. L., G. M. TOMKINS et J. J. BUNIM: Synthesis of hyaluronic acid by human synovial tissue slices. *Science* **125**, 1300 (1957).
- ZACHARIAE, F., and M. O. DYRBYE: Methods for isolation and identification of acid mucopolysaccharides in connective tissue. *Acta rheum. scand.* **5**, 190—205 (1959).
- ZAMBOTTI, V.: Die Biochemie des Knorpels, der zum Knochen umgebaut wird, und die Verknöcherung. *Sci. med. ital.* **5**, 630—660 (1957).
- ZBINDEN, G.: Der hyaline Knorpel im elektronenmikroskopischen Bild. *Z. wiss. Mikr.* **61**, 231—238 (1953).
- Über Feinstruktur und Altersveränderungen des hyalinen Knorpels im elektronenmikroskopischen Schnittpräparat und Beitrag zur Kenntnis der Verfettung der Knorpelgrundsubstanz. *Schweiz. Z. allg. Path.* **16**, 165—189 (1953).
- ZELANDER, T.: Ultrastructure of articular cartilage. *Z. Zellforsch.* **49**, 720—738 (1959).

Prof. Dr. KARL-HEINRICH KNESE, Anatomisches Institut der Universität Kiel,
Neue Universität, Eingang F 1

From the Institute of Normal Human Anatomy of the University of Milan
(Director: Prof. A. BAIKATI)

SUBMICROSCOPIC STRUCTURE OF THE MEMBRANOUS LABYRINTH

2. THE EPITHELIUM OF CORTI'S ORGAN*

By

SALVATORE IURATO

With 25 Figures in the Text

(Received July 18, 1960)

Introduction

This paper sets forth data on the submicroscopic structure of the epithelium of CORTI's organ. The results obtained have been compared with the classical data emerging from extensive research with the light microscope (CORTI 1851; CLAUDIUS 1855; DEITERS 1862; HENSEN 1863; RETZIUS 1884; AYERS 1891; HELD 1902, 1909, 1924, 1926; BÖTTCHER 1904; KOLMER 1910, 1927; BORGHESEAN 1949, 1952, 1954, 1955, 1957, 1959 etc.) as well as with the results of recent phase contrast microscope (KATSUKY and COVELL 1953; VAGO 1955) and electron microscope studies (ENGSTRÖM and WERSÄLL 1953a, 1953b, 1958; ENGSTRÖM 1955, 1958; ENGSTRÖM, SJÖSTRAND and WERSÄLL 1953; SMITH 1955, 1957; SMITH and DEMPSEY 1957; SPOENDLIN 1957, 1958, 1959; GRAY and PUMPHREY 1958; FRIEDMANN 1959a, 1959b).

Technical data

The research was performed on the cochlear duct of young and adult white rats (*Mus decumanus*, Sprague-Dawley stock). The animals were anaesthetized with tri-brom-ethyl alcohol (Avertin) 200 mg/kg.

Fixation was performed by injecting cold ($+1^{\circ}$) PALADE's solution directly into the labyrinth of the live animal through the round window and other apertures made in the various whorls of the cochlea with a dental drill (10000 r.p.m.) using the Zeiss dissecting microscope for control.

In some cases, after tracheotomy and intubation through the tracheal opening, intravital fixation of the entire cephalic district was performed with controlled respiration to avoid the onset of anoxia.

After being left in the fixative for 4 hours at $+1^{\circ}$, the specimens were included in a mixture of n-butyl and methyl metacrylate and sliced with the Porter-Bloom microtome.

Thicker sections (0.5μ) mounted in glycerine were studied by phase contrast and polarized light microscopy.

In some cases the ultrathin sections were contrasted with uranylacetate as proposed by WATSON (1958). Siemens Elmiskop II and Siemens Elmiskop I electron microscopes were used for observations¹.

* This work is dedicated to the memory of the late Prof. L. PIETRANTONI.

¹ The Siemens Elmiskop II belongs to the C. N. R. and the Siemens Elmiskop I belongs to the INAIL Laboratory of the Clinic for Occupational Diseases of the University of Milan. The author makes grateful acknowledgements to Dr. S. DE PETRIS for technical aid in obtaining electron micrographs with the Siemens Elmiskop I.

Hair cells

Form, site and connections

a) Inner hair cells (i. h. c.). Some authors, such as HENSEN (1863), HELD (1902) and others working with the light microscope, have considered the i. h. c. body as being enclosed within an intraepithelial space filled with liquid and traversed by a few star-shaped cells and slender nerve fibres only. The i. h. c. would therefore hang from the surface membrane and have an oval shape.

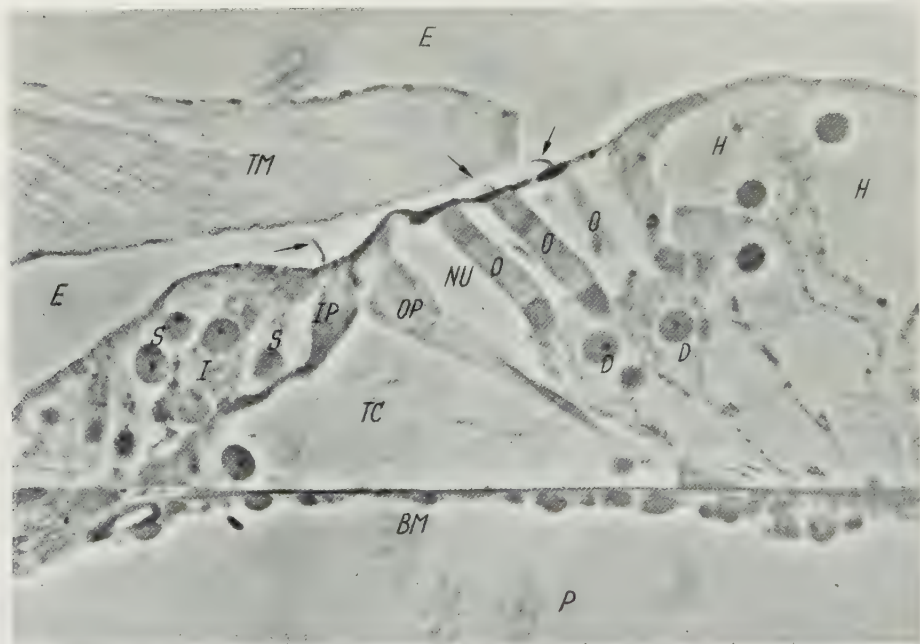


Fig. 1. Organ of Corti (apical whorl) examined by phase contrast after fixation in Palade fluid. Enlargement 750 \times . *TM* tectorial membrane, *BM* basilar membrane, *TC* Corti's tunnel, *NU* NUEL's space, *IP* inner pillar cell, *OP* outer pillar cell, *I* inner hair cell, *O* outer hair cell, *S* inner supporting cell, *D* DEITERS' cell, *H* HENSEN's cell, *E* endolymphatic space (scala media), *P* perilymphatic space (scala tympani). The arrows show the hairs of the sensory cells

Electron microscope investigations have ruled out the existence of spaces or cavities round the contour or at the base of the i. h. c. They are arranged close each other and against the inner supporting cells by which they are wrapped (see inner supporting cells, p. 287) and by the nerve expansions (Fig. 3, 4).

Being thus closely inter-related with the supporting cells, the i. h. c. have a polyhedral form and resemble hexagonal prisms with regular centre facets (Fig. 3), while the two ends are much narrower. The lower end is an irregular prism, and the upper end is an ellipse with its major axis running parallel and lengthwise to the cochlear canal (Fig. 25).

Between the axis of the i. h. c. and the basilar membrane there is an angle of 140° opening towards the modiolus.

b) Outer hair cells (o. h. c.). The electron microscope investigations have confirmed the existence of intraepithelial spaces containing liquid, viz. of NUEL's space (between the outer pillar cells and the 1st series o. h. c.), of outer tunnel

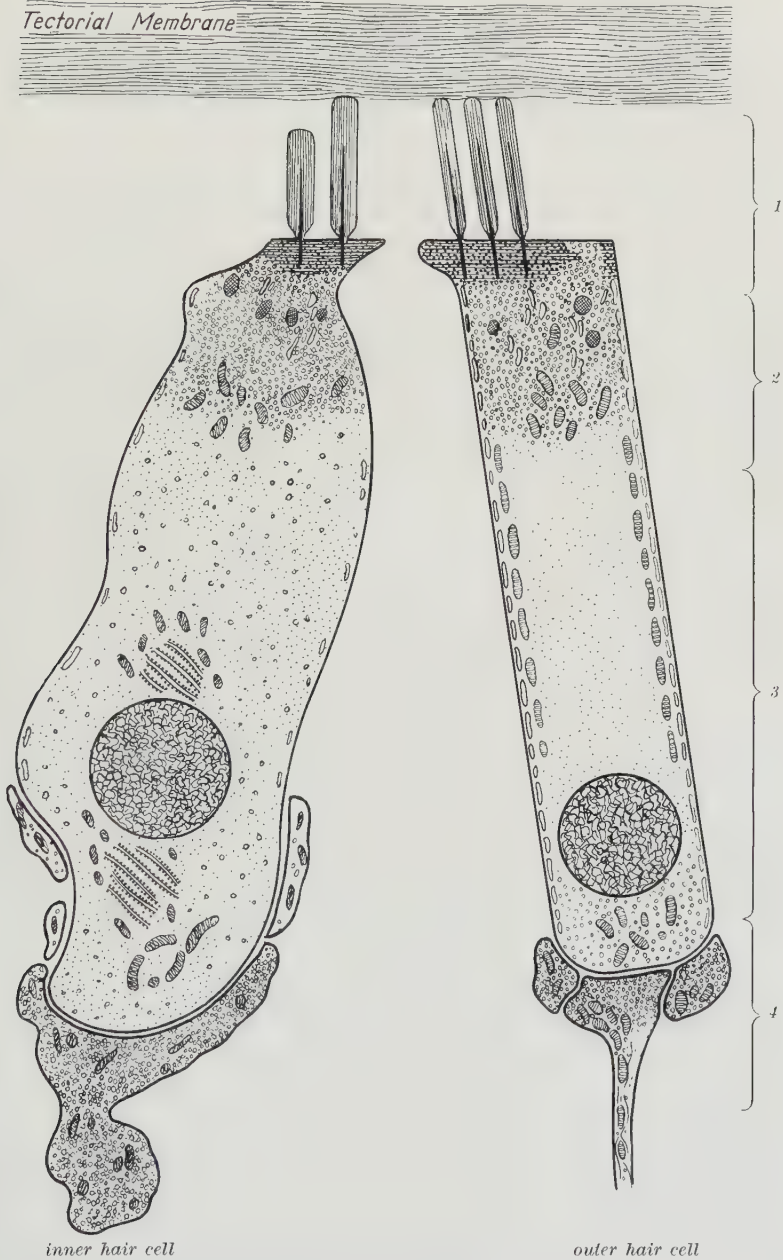


Fig. 2. Diagram of the basic observations on the submicroscopic structure of the sensory hair cells. From top to bottom apical zone (1), intermediate zone (2), perinuclear zone (3) and receptoneural junction (4)

(between the o.h.c. of the series further from the modiolus and the HENSEN's cells), as well as of fairly large spaces around the o.h.c. These spaces are only traversed by the slender portion (neck) of DEITERS' cells (Fig. 1, 3, and 4b).

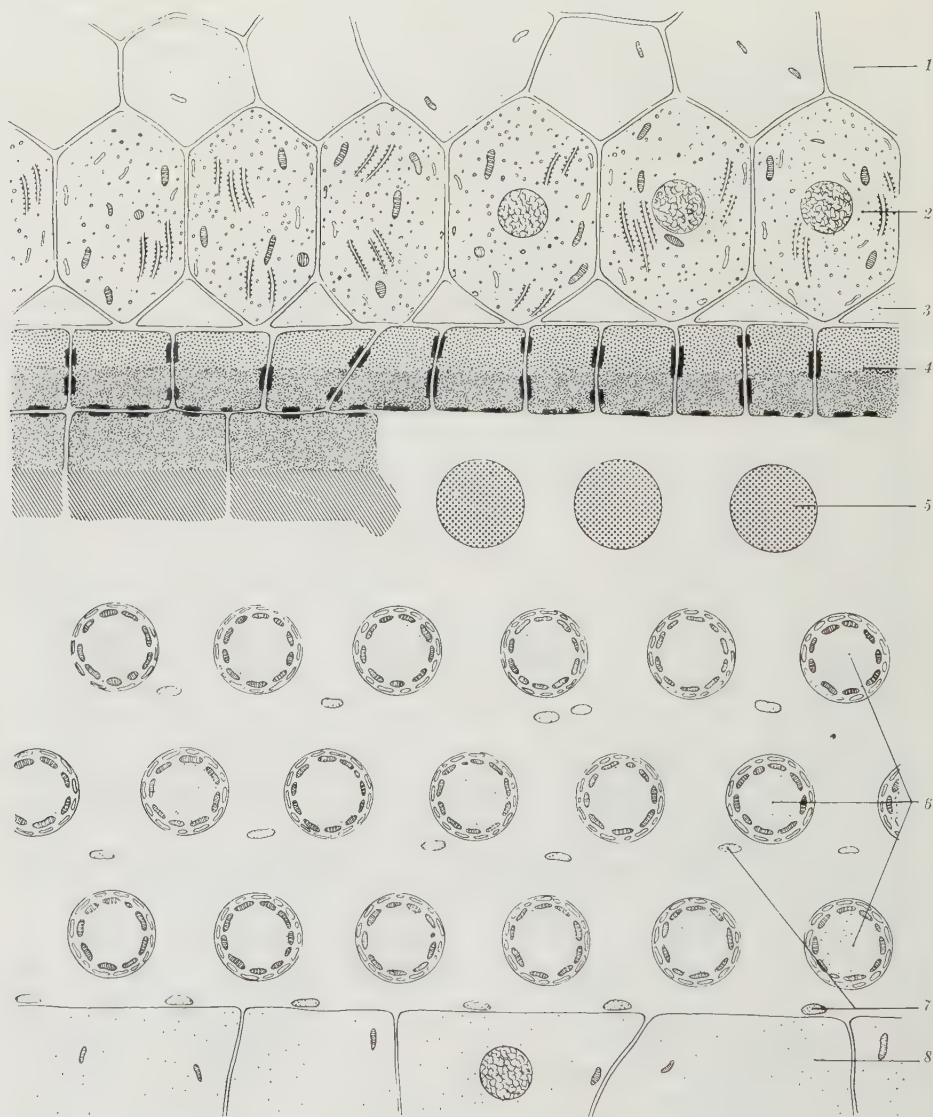


Fig. 3. Schematic drawing of a slightly oblique cross section of the epithelium of Corti's organ. It is evident that the inner hair cells are completely banked on all sides by the supporting cells, whereas the outer hair cells are entirely surrounded by intraepithelial liquid. From top to bottom inner supporting cells (1), inner hair cells (2), inner supporting cells (3), inner pillar cells (4), outer pillar cells (5), outer hair cells (6), necks of DEITERS' cells (7), HENSEN'S cells (8)

The o.h.c. thus appear stretched between two fixed points of attachment: one at the reticular membrane and a lower one at the cup-shaped part of the DEITERS' cells. In the absence of contact with other cells, they appear like long rods with a dome-shaped deeper end, while the upper end, wedged between the phalanges of the DEITERS' cells, is roughly hexagonal, terminating with a flattened surface (Fig. 2, 3 and 4b). The main portion, or body, of the o.h.c. is entirely surrounded by an intra-epithelial fluid.

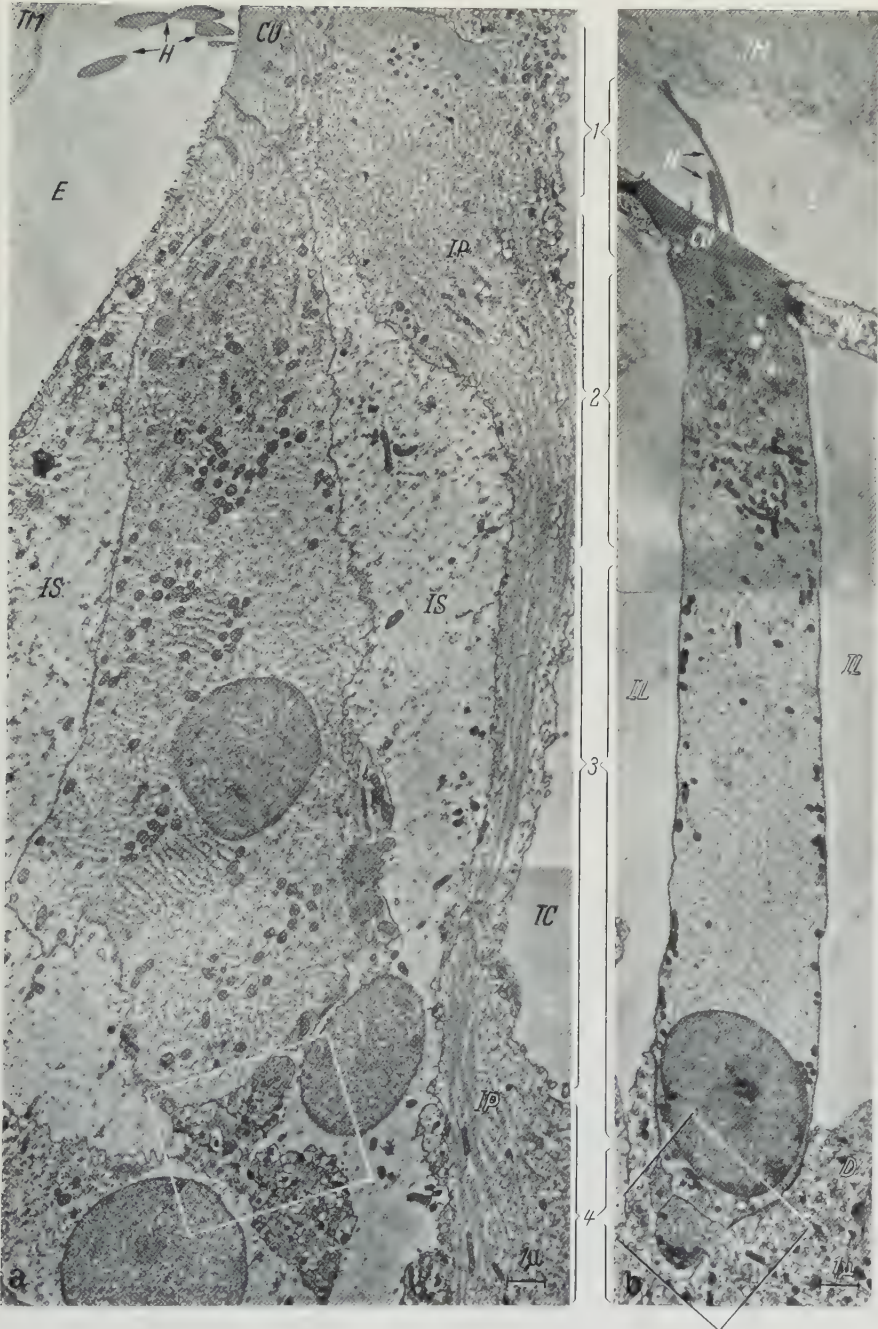


Fig. 4. a Inner hair cell; b outer hair cell (apical whorl). These cells have been turned through an angle to reproduce them both in the figure. From top to bottom apical zone (1), intermediate zone (2), perinuclear zone (3) and receptorncural junction (4). *TM* tectorial membrane, *IS* inner supporting cell, *D* DEITERS' cell, *IP* inner pillar cell, *PH* phalanx of DEITERS' cell, *CU* cuticle, *H* hairs, *TC* Corti's tunnel, *E* endolymphatic space, *IL* intercellular space. The outlined zones in a and b correspond to Fig. 11a and b respectively. Enlargement 5000 ×

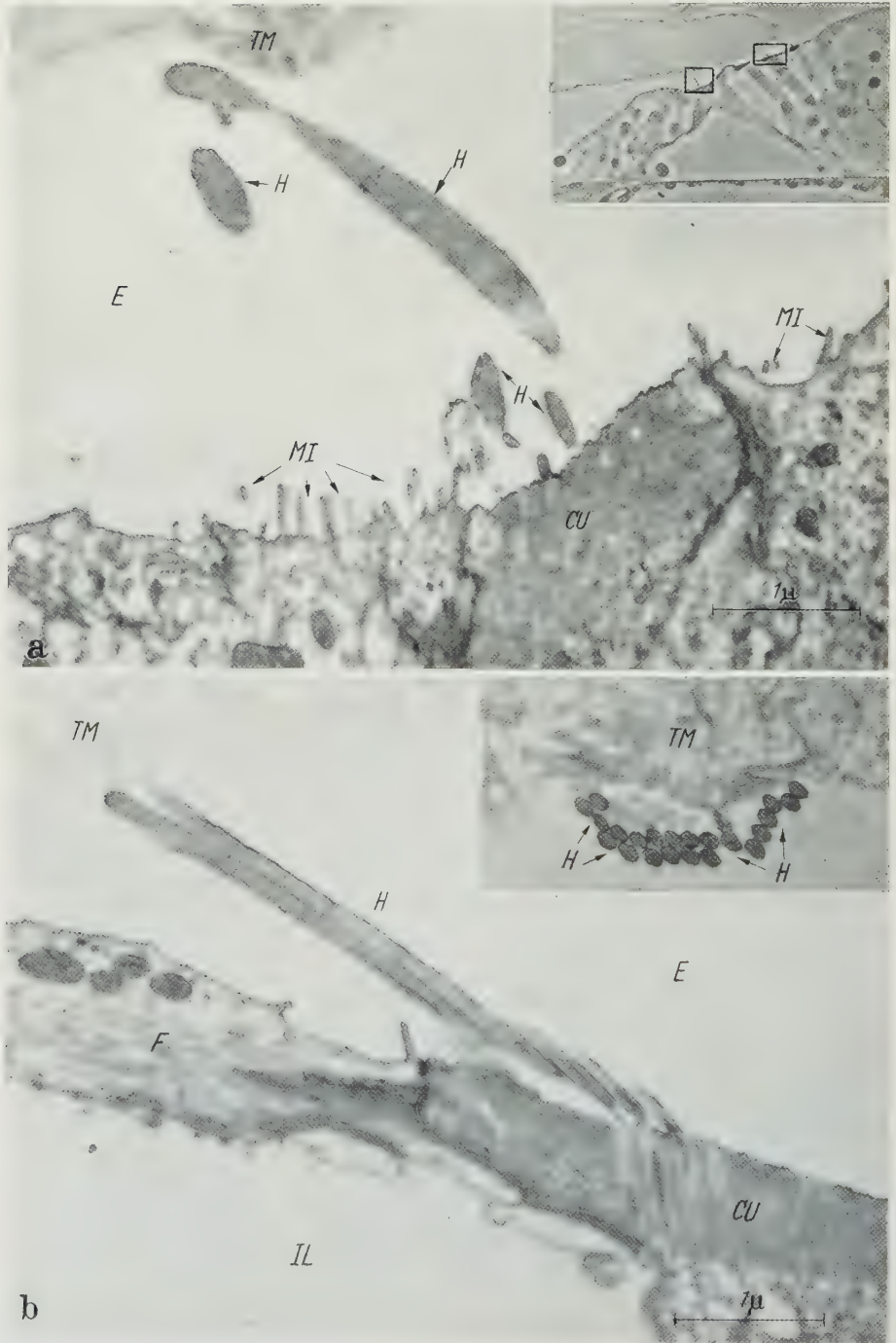


Fig. 5a and b. Surface zone of inner hair cell (a) and outer hair cell (b) of the apical whorl. Enlargement 20000 \times . *TM* tectorial membrane, *H* hairs, *CU* cuticle, *MI* microvilli, *F* filaments of a pillar cell, *E* endolymphatic space, *IL* intercellular space. In inset (a) organ of Corti examined by phase contrast (330 \times); the zone outlined on left corresponds to Fig. 5a, while the zone outlined on right corresponds to Fig. 5b. The tops of the hairs are in contact with the tectorial membrane, but there is no structural continuity. The strong bending of the outer hair cell hairs is probably an artefact. In inset (b) the hairs are cut cross-wise. Enlargement 20000 \times

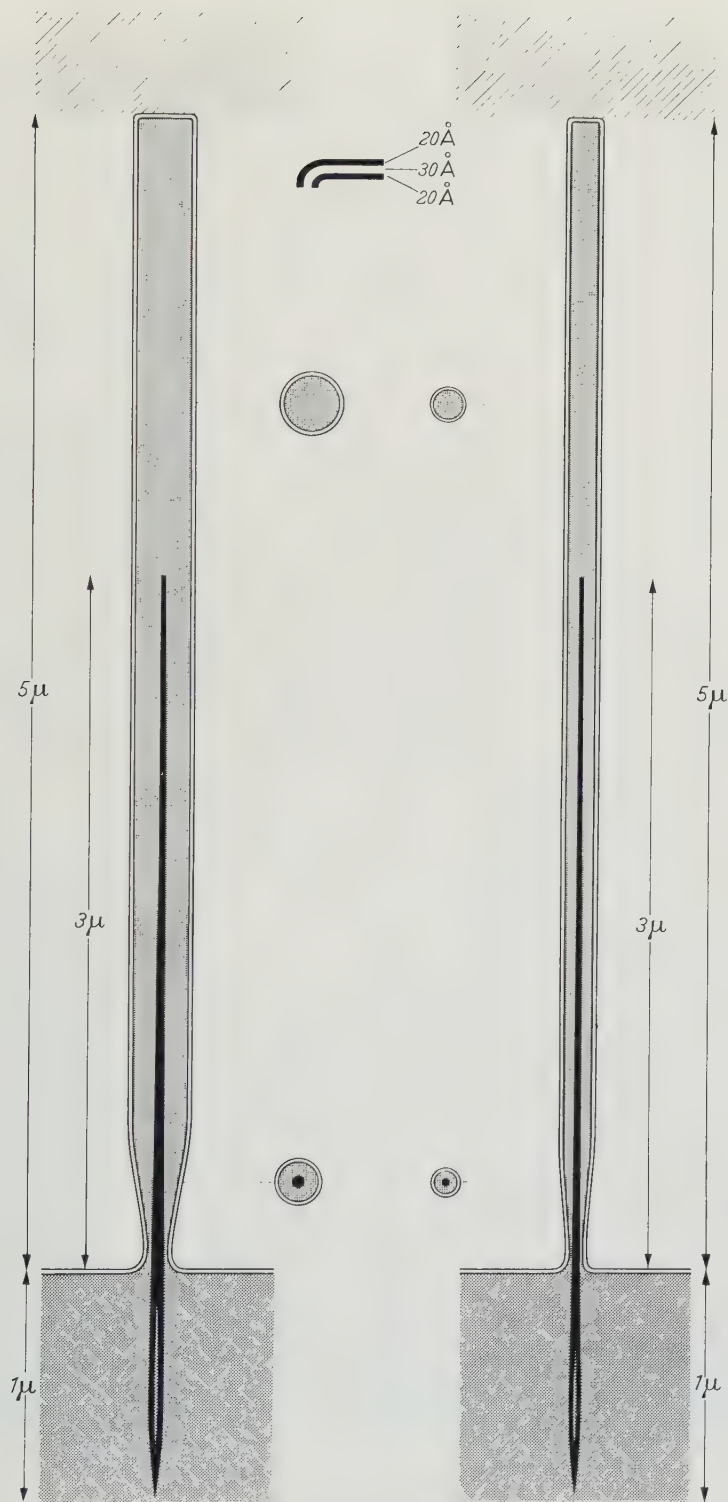


Fig. 6. Schematic drawing showing the submicroscopic organisation of the auditory hairs. Left, an inner hair cell hair. Right, an outer hair cell hair. In both can be distinguished an intracellular part or hair root, a narrow part or neck and an extracellular part or the hair proper. The average diameter of the inner hair cell hairs is about double that of outer hair cell hairs

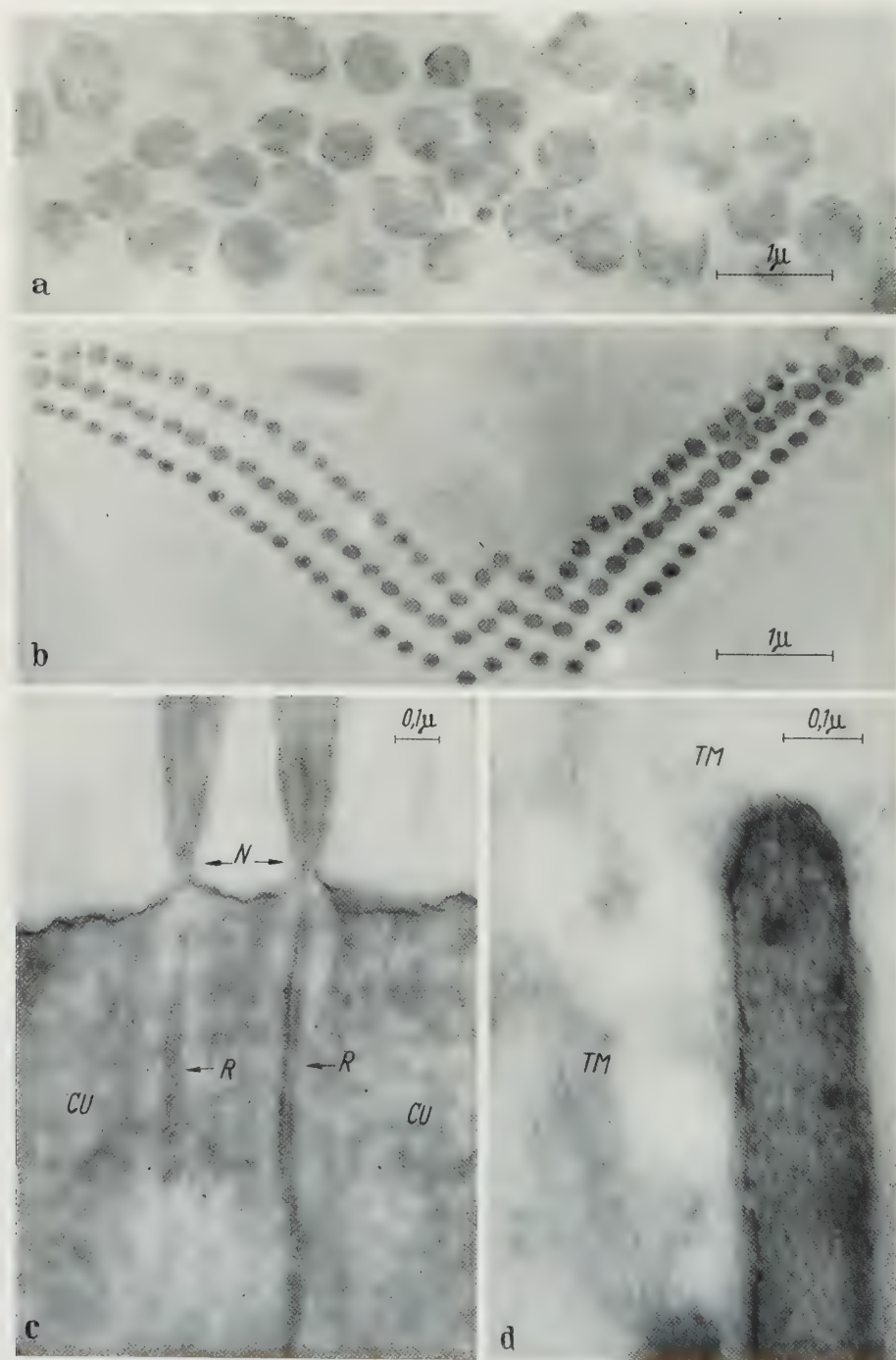


Fig. 7. a Cross section of hairs from an inner hair cell of the middle whorl (enlargement $15\,000\times$); b with the same enlargement, cross section of hairs from an outer hair cell of the same whorl; the different diameter of the two images is noteworthy. c The neck (*N*) and the hair root of two inner hair cell hairs; the tube-shaped structure of the hair root (*R*), planted in the cuticle (*CU*) can be noted. Enlargement $60\,000\times$. d Top end of two outer hair cell hairs located in extremely close contact with the tectorial membrane (*TM*). Enlargement $100\,000\times$

The length of the adult rat o.h.c. is $23\ \mu$ in the apical whorl and $13\ \mu$ in the basal whorl.

The axis of the o.h.c. meets the basilar membrane at an angle of 45° and the reticular membrane at an angle of about 110° — 150° opening towards the modiolus.

Structure

The outer and the inner hair cells are organised according to a similar pattern. They are secondary sensory cells of an epithelial type and ciliated. They are closely interrelated with the peripheral nerve-endings of the spiral ganglion cells.

It is possible to identify a boundary membrane, a hyaloplasm, a nucleus, cytoplasmic organoids and some particular inclusions.

The various components are differently arranged in the different parts of the cell, allowing 4 zones or layers of different structure to be distinguished. These can be called, from the surface inwards: apical zone, intermediate zone, perinuclear zone, receptoneural junction.

This arrangement is quite evident in the o.h.c., whereas in the i.h.c. there is a more gradual change from one zone to the other and their structural disparities are less appreciable (Fig. 2 and 4).

a) Apical zone. It is formed by a cuticle, varying between 0.7 and $0.1\ \mu$ in thickness, in which the cilia or auditory hairs are planted. The o.h.c. cuticle stands out about $1\ \mu$ towards the modiolus. At the opposite side there is a small area which has the same structure of the intermediate zone (Fig. 2, 4b and 5b). The cuticle has an intrinsic birefringence which is positive to the tangent and hence negative with respect to the cellular axis. Under the electron microscope it appears homogeneous and electron-opaque and one cannot distinguish either cytoplasmatic structures or an oriented submicroscopic organisation that could explain finding with the polarised light (Fig. 5, 7c and 9).

The only structure that can well be differentiated is the cellular boundary membrane, which is $70\ \text{\AA}$ thick and consists of 2 electron-opaque layers, each $20\ \text{\AA}$ thick and divided by a clearer space of $30\ \text{\AA}$ thickness. At the surfaces of contact with the neighbouring cells the boundary membrane appears much thicker, being strengthened by a strip of more compact material. These thicker areas resemble the terminal bars and take part in the formation of the reticular membrane (Fig. 21a). This point will be discussed in more detail when the structure of the supporting cells has also been dealt with.

Light microscope investigations (HELD 1926 etc.) have already provided much data on the shape, number and dimensions of the hairs; quantitative data obtained using the electron microscope are given in Table 1.

Comparing our data with those of ENGSTRÖM and WERSÄLL (1953a, 1958) and SPOENDLIN (1957), the submicroscopic organisation of the auditory hair can be reconstructed in the following way (Fig. 2, 4—9).

Observing the hair an intracuticular part, or hair root, can be distinguished, a narrow part or neck and the hair proper.

The *intracuticular portion or hair root* is tube-shaped, very dense structure and planted in the cuticle (Fig. 6 and 7c).

The *narrow portion or neck of the hair* is situated at the point where the hair emerges from the cuticle to the surface of the auditory cell (Fig. 6 and 7c). Its diameter is not more than $500\ \text{\AA}$.

The *hair proper* is at the most $4.3\text{--}5\ \mu$ long. It runs from the free surface of the hair cell to the tectorial membrane (Fig. 1, 2, 4 and 5) and has an average

Table 1. *Dimensions of inner and outer hair cells hairs*
(in micron)

	Apical whorl	Middle whorl	Basal whorl
inner hair cell-hairs			
Length of hair proper	4.3 ± 0.22	3.9 ± 0.27	2.3 ± 0.25
Max. diameter . . .	0.31 ± 0.015	0.35 ± 0.016	0.34 ± 0.019
Number per cell . .	41 ± 5	28 ± 6	32 ± 4
outer hair cell-hairs			
Length of hair proper	4.4 ± 0.25	3.5 ± 0.22	2.7 ± 0.32
Max. diameter . . .	0.17 ± 0.009	0.15 ± 0.004	0.12 ± 0.010
Number per cell . .	62 ± 8	96 ± 5	75 ± 6

diameter of $0.15\ \mu$ in the o.h.c. hairs and of 0.35 , or about double, in the i.h.c. hairs (Fig. 7a and b). In various whorls small variations occur. This is shown in Table 1.

The hair proper consists of a strongly electron-opaque axial fibril, continuous with the hair root and extending for

about 2/3 the length of the hair. The axial fibril is surrounded by less opaque material of similar appearance to the hair cell cuticle. So far electron microscopy has not revealed a definite filamentous structure in this material. However, in some specimens, one sees a fine striation which runs parallel to the axis of the hair. When investigated under the polarised light the hairs revealed a positive birefringence with respect to the elongation, a finding which corroborates the assumption that the component material is oriented along the major axis of the hair.

Lastly, this material is covered by a boundary membrane of the same structure as the cell membrane of which it is an extension (Fig. 6 and 8).

The auditory cell hairs are closely inter-related with the tectorial membrane, since the top end of the hairs is in contact with this membrane (Fig. 5). In some specimens I was able to evidence the tectorial membrane, or small pieces of it, clinging to the apical end of a hair (Fig. 7d). These pictures show, however, that there is no structural continuity between the tectorial membrane and the hair (in toto or with a part thereof), as the double membrane is always a boundary of the hair, the material of which has a very different structure from the tectorial membrane.

It must thus be concluded that the hair cell hairs and the tectorial membrane are placed in a relationship of extremely close contact (the detachments described with ordinary techniques are artificial), but that there is no structural continuity.

b) Intermediate zone. This is characteristically crowded with cytoplasmic organoids. In this zone the boundary membrane of the o.h.c. acquires certain peculiarities. Beneath the continuous surface layer constituting the boundary membrane proper numerous flat vesicles are aligned. Their major axis runs parallel to the cell surface. This finding was also made by ENGSTRÖM and WERSÄLL (1953a, 1958), SPOENDLIN (1957, 1959), SMITH and DEMPSEY (1957). They described in o.h.c. of the guinea-pig at this point either a series of flat vesicles or, occurring in far large quantities, continuous membranes of a myelinic type. Since there are transitional aspects between these two structures, SPOENDLIN stated that continuous membranes are the most probable. Being extremely delicate, it would seem that they break during fixation producing vesicular images. In the rat I have never observed a series of continuous membranes and can therefore not express an opinion on SPOENDLIN's interpretation.

In the hyaloplasm a large number of canaliculi can be observed, with many medium-sized and large cisterns having PALADE's granules, frequently situated close to each other.

In this zone of the o.h.c. various highly dilated GOLGI's fields can be seen situated immediately beneath the cuticle (Fig. 9), and numerous mitochondria agglomerated in various strata beneath the GOLGI's fields forming a distinct boundary layer with the underlying zone (Fig. 4b and 10).

In the rat the GOLGI's fields are composed of canalicular systems, running straight or slightly winding, never concentric. I have never observed the structures which have been described in the guinea pig as HENSEN's bodies by light microscopists and which appear, according to the electron microscope observations of ENGSTRÖM and WERSÄLL (1953a, 1958), ENGSTRÖM, SJÖSTRAND and WERSÄLL (1953), SMITH and DEMPSEY (1957) and SPOENDLIN (1957, 1959), to be formed by GOLGI's fields consisting of concentrically arranged parallel laminae surrounded by groups of mitochondria.

In the i.h.c. the GOLGI's fields and the "endoplasmic reticulum" cisterns are less developed. The mitochondria are found immediately beneath the cuticle. (The intermediate zone therefore has a simpler structure.)

In both types of cells some spherical or oval formations with a diameter of $0,2-0,4 \mu$ can be noted. They are characterised by an own boundary membrane

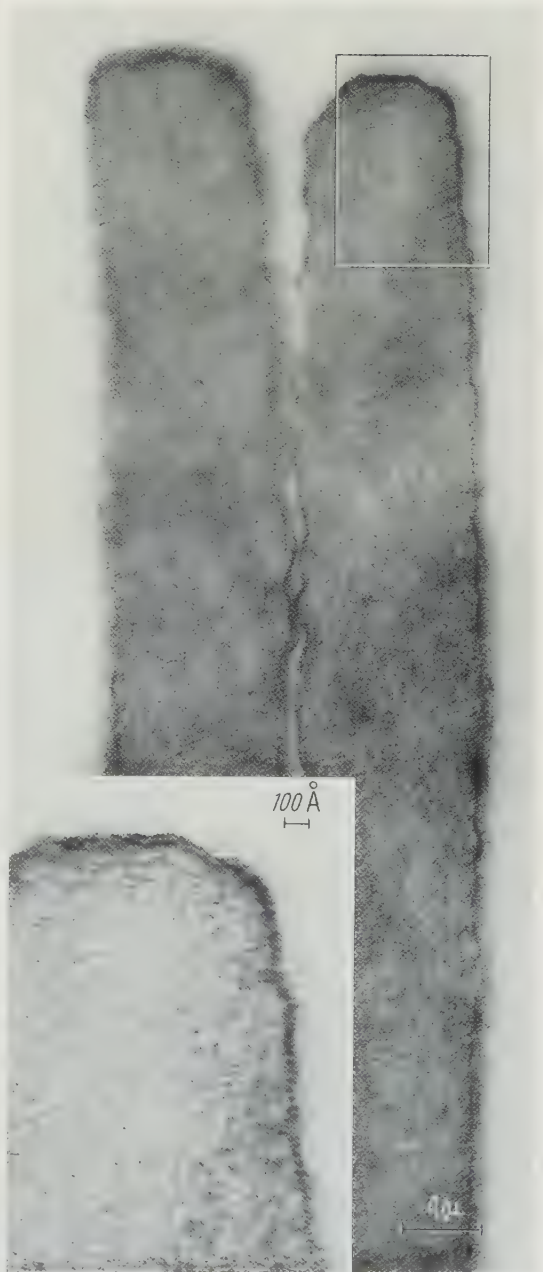


Fig. 8. Two hairs from an inner hair cell of the apical whorl. Enlargement $100\,000\times$. In the inset, a more highly enlarged image ($250\,000\times$); the boundary membrane, 70 Å thick, consisting of 2 electron-opaque layers each 20 Å thick divided by a clearer space 30 Å thick, can be observed

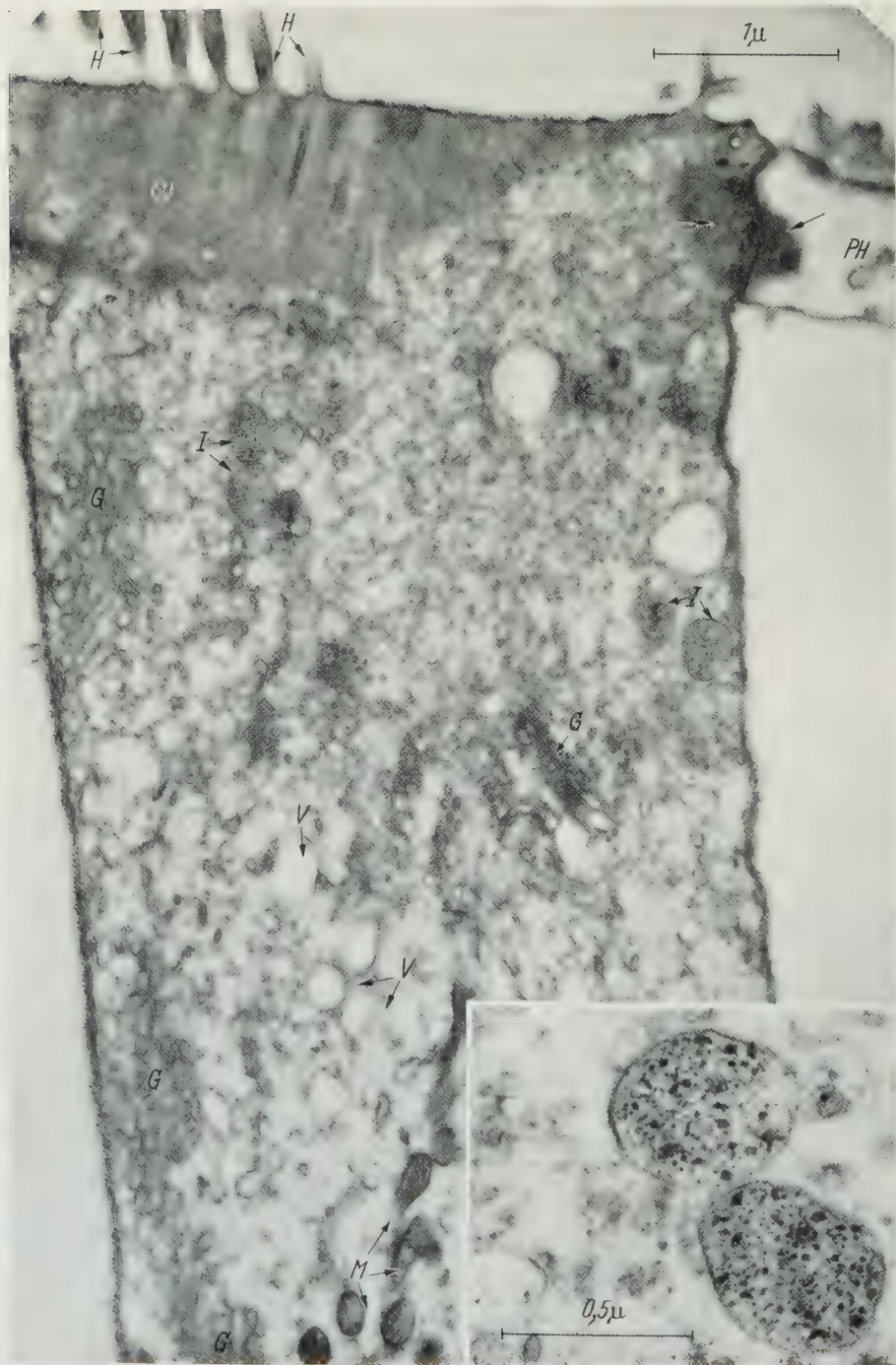


Fig. 9. Intermediate zone of an outer hair cell of the apical whorl: beneath the cuticle (*CU*) various highly dilated GOLGI's fields (*G*) can be observed, a large number of canaliculi and many medium-sized and large cisternae (*V*); lastly some spherical inclusions (*I*) can be noted and some mitochondria (*M*); *H* hairs; *PH* phalanx of a DEITERS' cell. The arrows show the peripheral thickenings of the boundary membrane which, joined together, form the so-called reticular membrane. Enlargement 24000 \times . The inset shows 2 inclusions with their own boundary membrane and a granular content. Enlargement 50000 \times

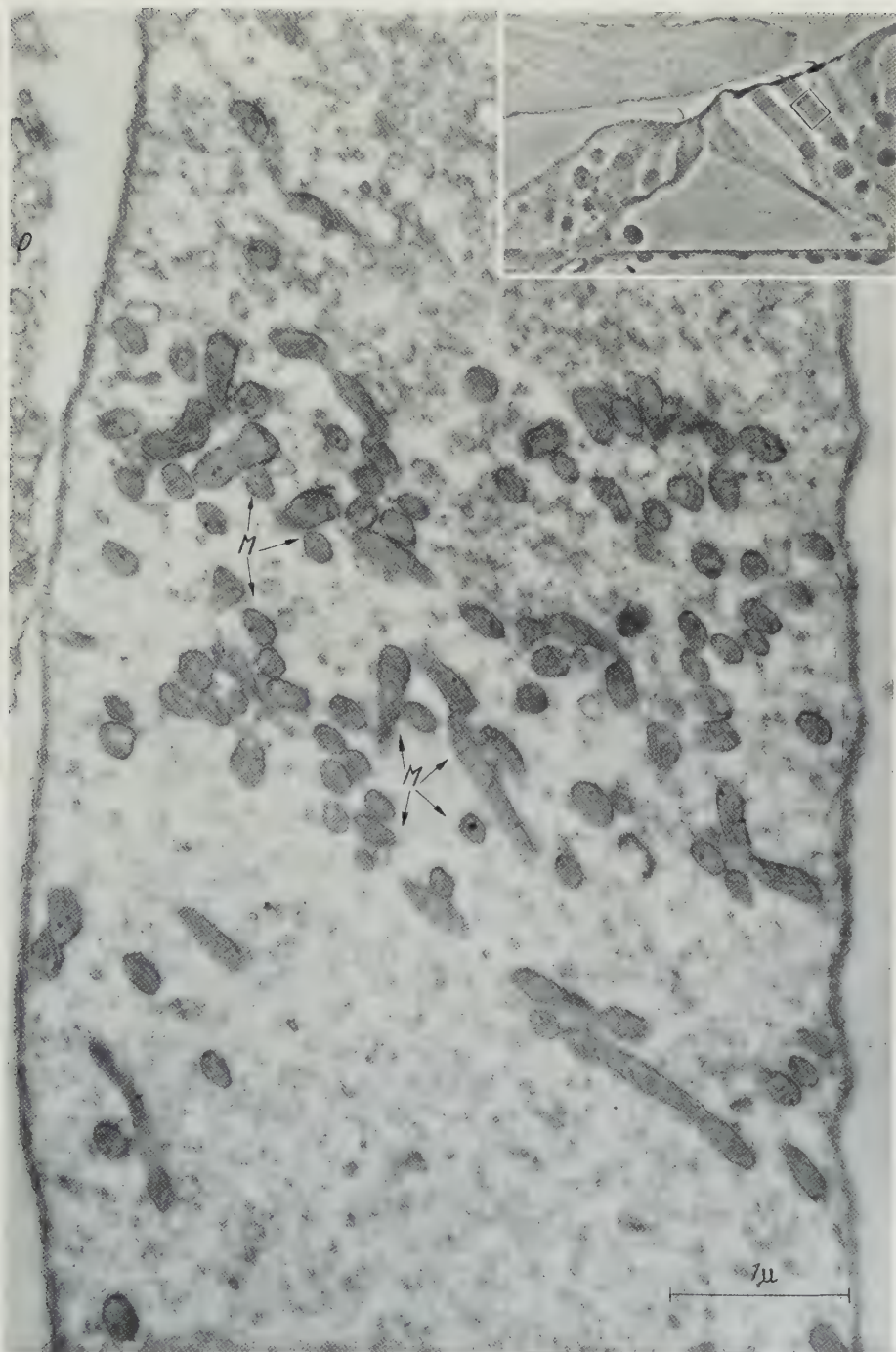


Fig. 10. The transition between the deeper part of the intermediate zone of an outer hair cell and the perinuclear zone is shown (apical whorl). The former is rich in mitochondria (*M*) while in the latter has few, placed immediately inside the boundary membrane; *D* neck of a DEITERS' cell. Enlargement 24000 \times . In the inset, organ of Corti examined by phase contrast (430 \times). The outlined area indicates the zone examined with the electron microscope

and a granular content, the nature and origin of which is unknown (Fig. 9, inset).

c) Perinuclear zone. This is the greatest portion of the cell and extends from the zone described above to the nucleus which is found in the basal portion of the cell. Electron microscope studies of the nucleus did not reveal any noteworthy structural characteristics.

There are more appreciable differences in the structure of the perinuclear zone in the two types of cells.

In the o.h.c. it is mainly formed of highly electron-transparent hyaloplasm, which looks finely granular. The vesicular structures of the endoplasmic reticulum are small and few (Fig. 10). The most constant peculiarity consists of rows of elongated mitochondria, immediately inside the boundary membrane, arranged with their major axis in the same direction as that of the cell (Fig. 2, 3 and 4b). A few mitochondria beneath the nucleus form an agglomeration corresponding to the formation described in light microscope findings as the RETZIUS' body (Fig. 11b).

In the i.h.c., on the contrary, in the hyaloplasm a large number of small vesicles and canaliculi can be observed (Fig. 13). Further the ergastoplasm can be noted in close spatial relationship to the nucleus. It is formed by 6—12 shallow lacunae outlined by membranes rich with granular material. They are surrounded by some mitochondria (Fig. 13). The latter, although less than in the intermediate zone, may be found scattered through out the i.h.c. hyaloplasm but never arranged in the parallel rows described in the o.h.c.

d) Receptoneural junction. On the basis of images obtained by the silver method, it has been said (HERINGA 1924, BOEKE 1926 and others) that the endings of terminal nerve fibres form a sensory network on the cell surface originating short expansions which penetrate inside the auditory cell.

This interpretation was not corroborated by the results of electron microscope investigations, which proved definitely that the endings of the terminal nerve fibres are always situated outside the cell and are wrapped in a continuous boundary membrane separated by a space of 150 Å from the cell membrane.

The following should be added to the data supplied by ENGSTRÖM and WERSÄLL (1958).

On the o.h.c. the receptoneural junctions are limited to the subnuclear region and generally look like buttons, with the flat or concave side facing the cell membrane. They vary in number from 3 to 5 per cell (Fig. 11b and 12). The endings of the terminal fibres always contain mitochondria and numerous microvesicles with a diameter of about 200—400 Å, very similar to the vesicles shown in the synapses (DE ROBERTIS and BENNETT 1954, PALAY and PALADE 1954, PALAY 1956, DE ROBERTIS 1958). There are no neurofilaments (Fig. 11b and 12).

On the i.h.c. the endings of the terminal nerve fibres form a main group at the base of the cell (Fig. 11a), but there are also some smaller and flat buttons on the sides of the cell (Fig. 13). The main group of sensory endings consists of an aggregation of slender, amyelinic axons, very close together, between which there are numerous small terminal fibre endings of the above type. The tangle of nerve fibres and terminal nerve endings are therefore wedged tightly together, which explains its spongy appearance, quite different from that of other synapses (Fig. 11a).

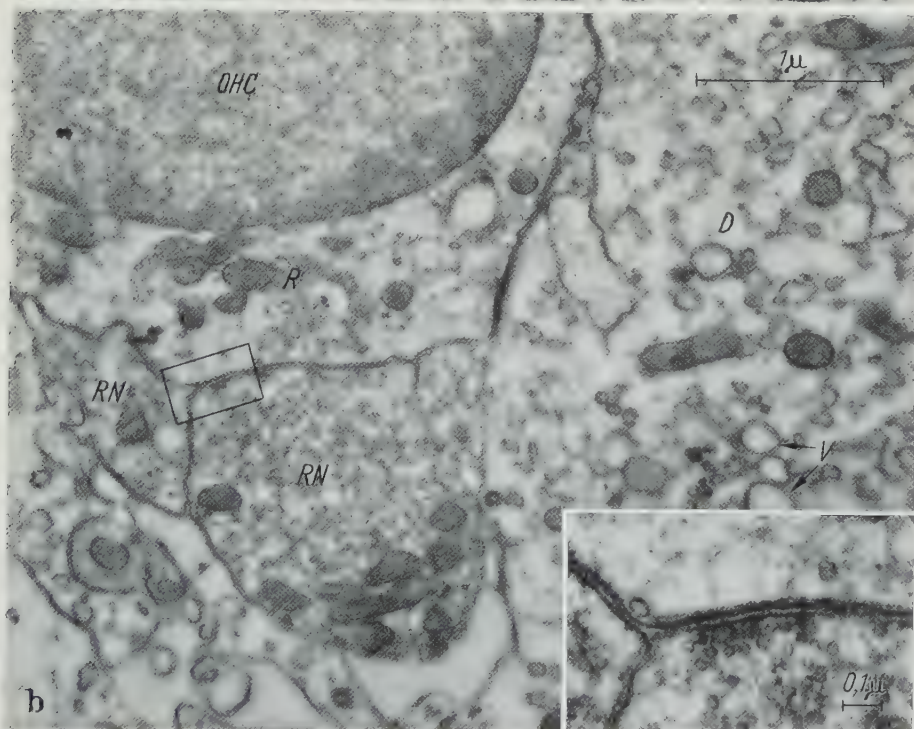
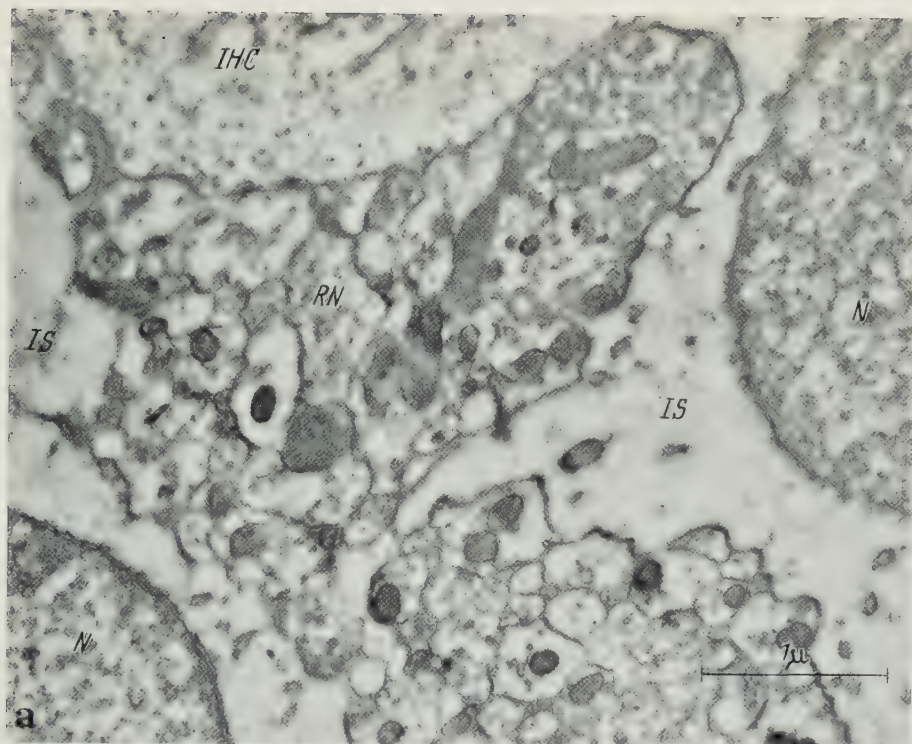


Fig. 11a and b. Receptoneural junction of an inner hair cell (a) and of an outer hair cell (b). The images correspond to the outlined zones of Fig. 4a and b respectively. *IS* inner supporting cell; *N* inner supporting cell nucleus; *RN* receptoneural junction; *D* DEITERS' cell; *R* RETZIUS' body; *V* vesicles in a DEITERS' cell. Enlargement 24000 \times . The inset in b shows a more highly enlarged image (45000 \times)

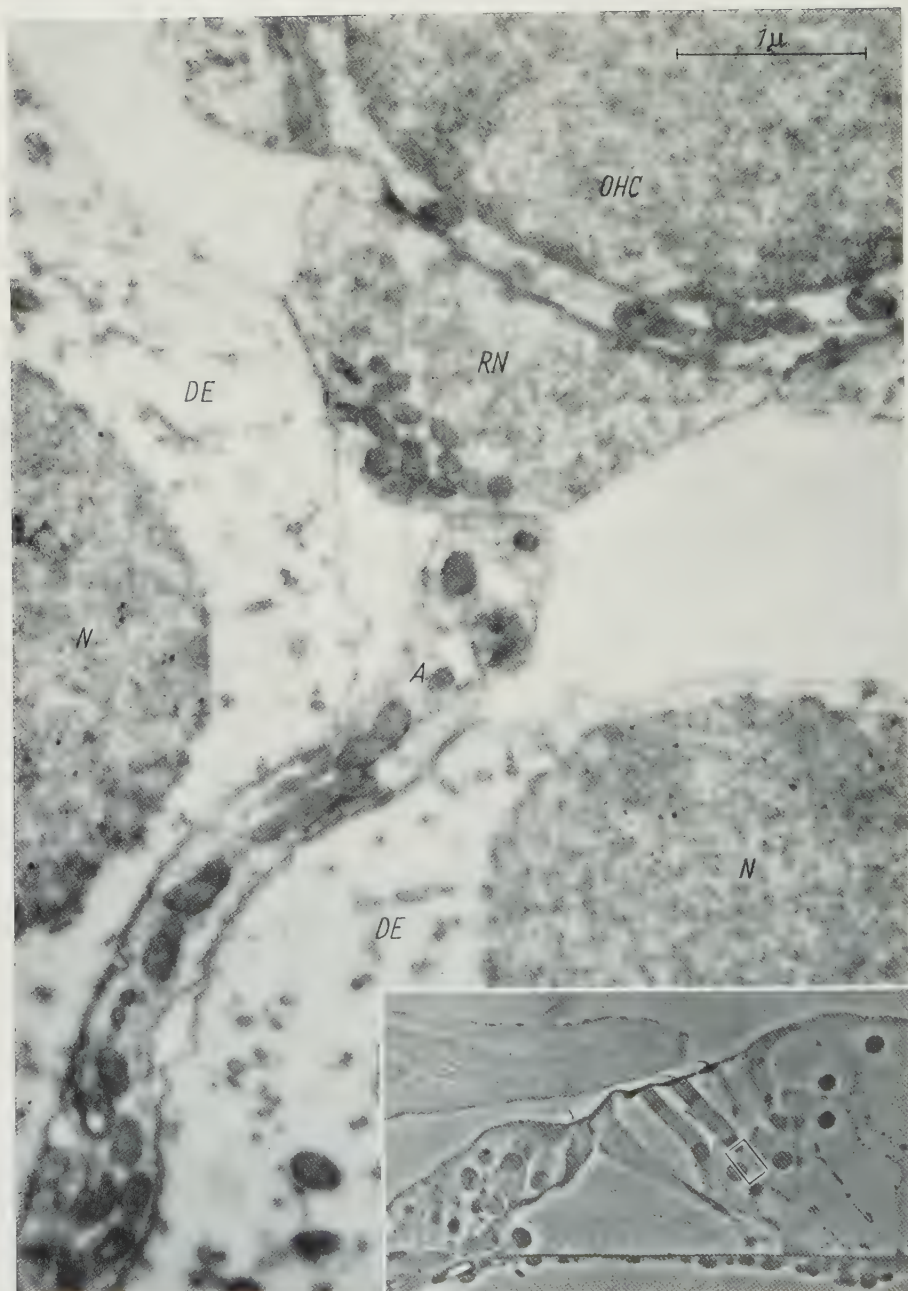


Fig. 12. Receptoneural junction (*RN*) of an outer hair cell (*OHC*) of the middle whorl with an axon (*A*) running between 2 DEITERS' cells (*DE*); *N* nucleus of DEITERS' cell. Enlargement 24000 \times . The inset shows the organ of CORTI examined by phase contrast (430 \times). The outlined area indicates the zone examined with the electron microscope

Lastly, it should be recalled that, with respect to the larger or smaller quantity of vesicles contained in the endings of the terminal nerve fibers, ENGSTRÖM (1958)

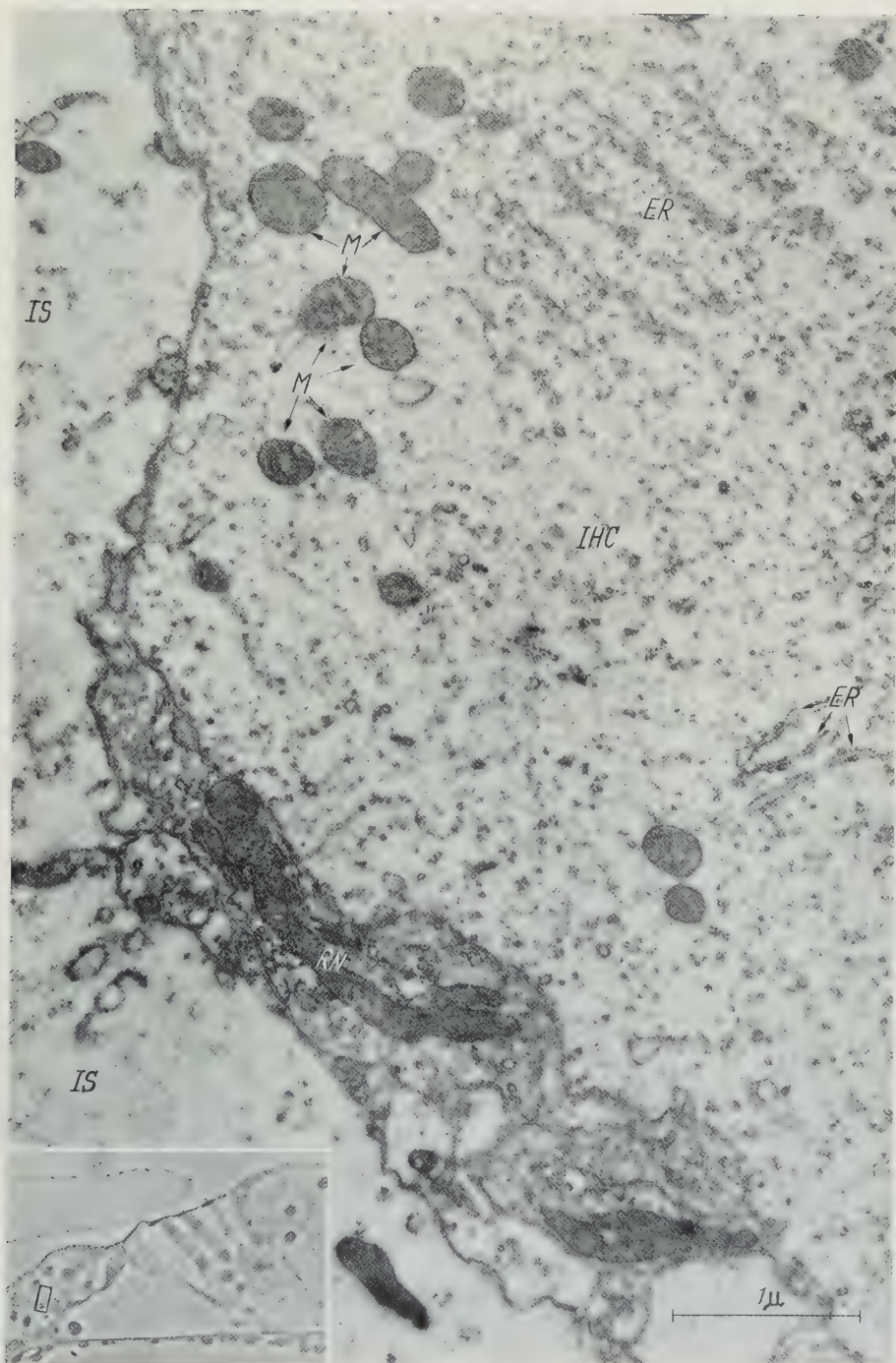


Fig. 13. Inner hair cell of the apical whorl with a flat receptoneural junction along the side face. *M* mitochondria; *ER* ergastoplasm; *RN* receptoneural junction; *IS* inner supporting cell. Enlargement 24000 \times . The inset shows the organ of Corti examined by phase contrast (330 \times). The outlined area indicates the zone examined with the electron microscope

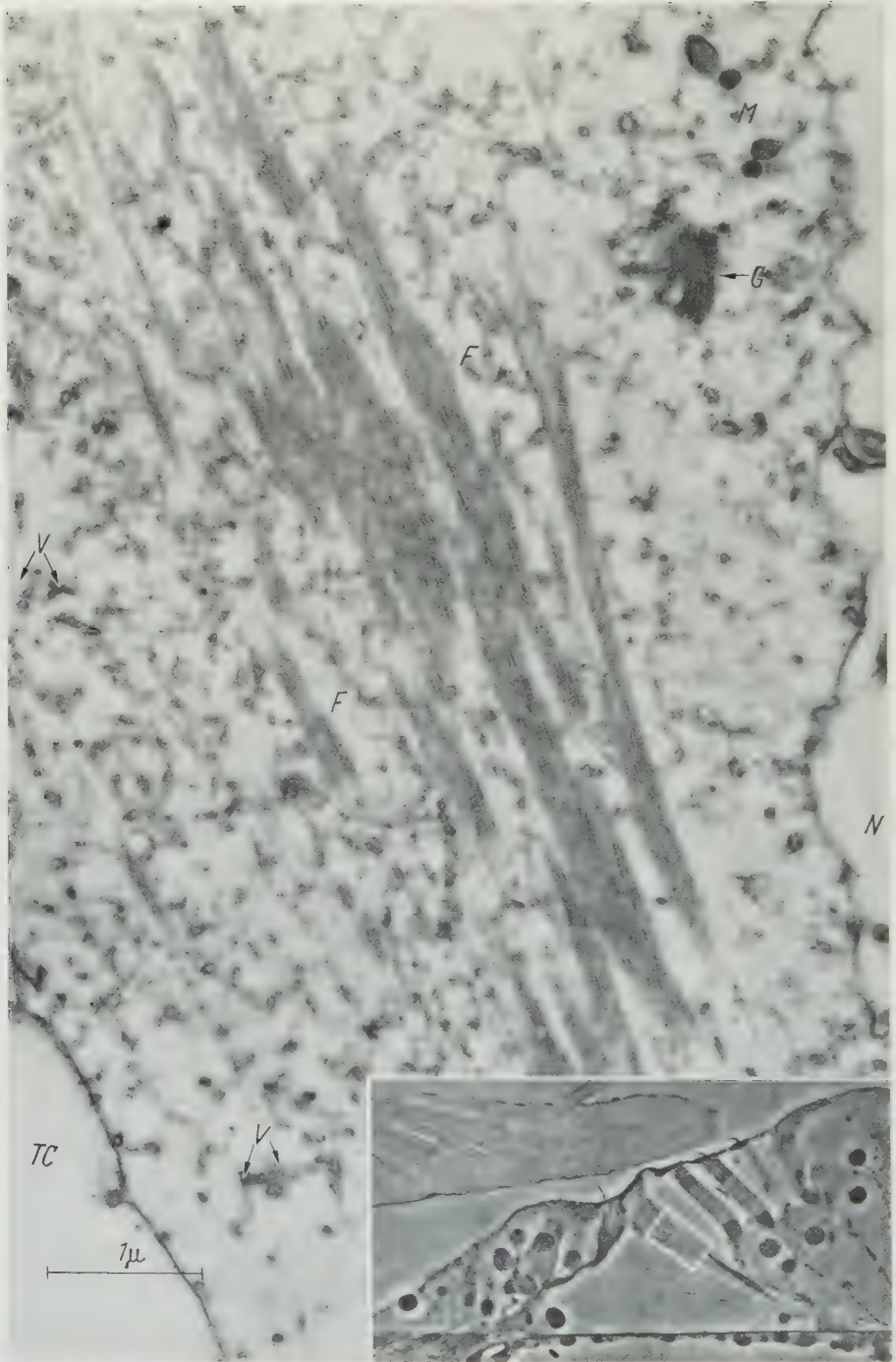


Fig. 14. Outer pillar cell of the apical whorl; the image shows the submicroscopic structure of the body of the outer pillar cell (*F* bundles of filaments; *G* GOLGI's field; *M* mitochondria; *V* small vesicles; *TC* CORR's tunnel; *N* NIEL's space). Enlargement 20000 \times . The outlined zone in the inset, by phase contrast (430 \times) shows the exact point of the section

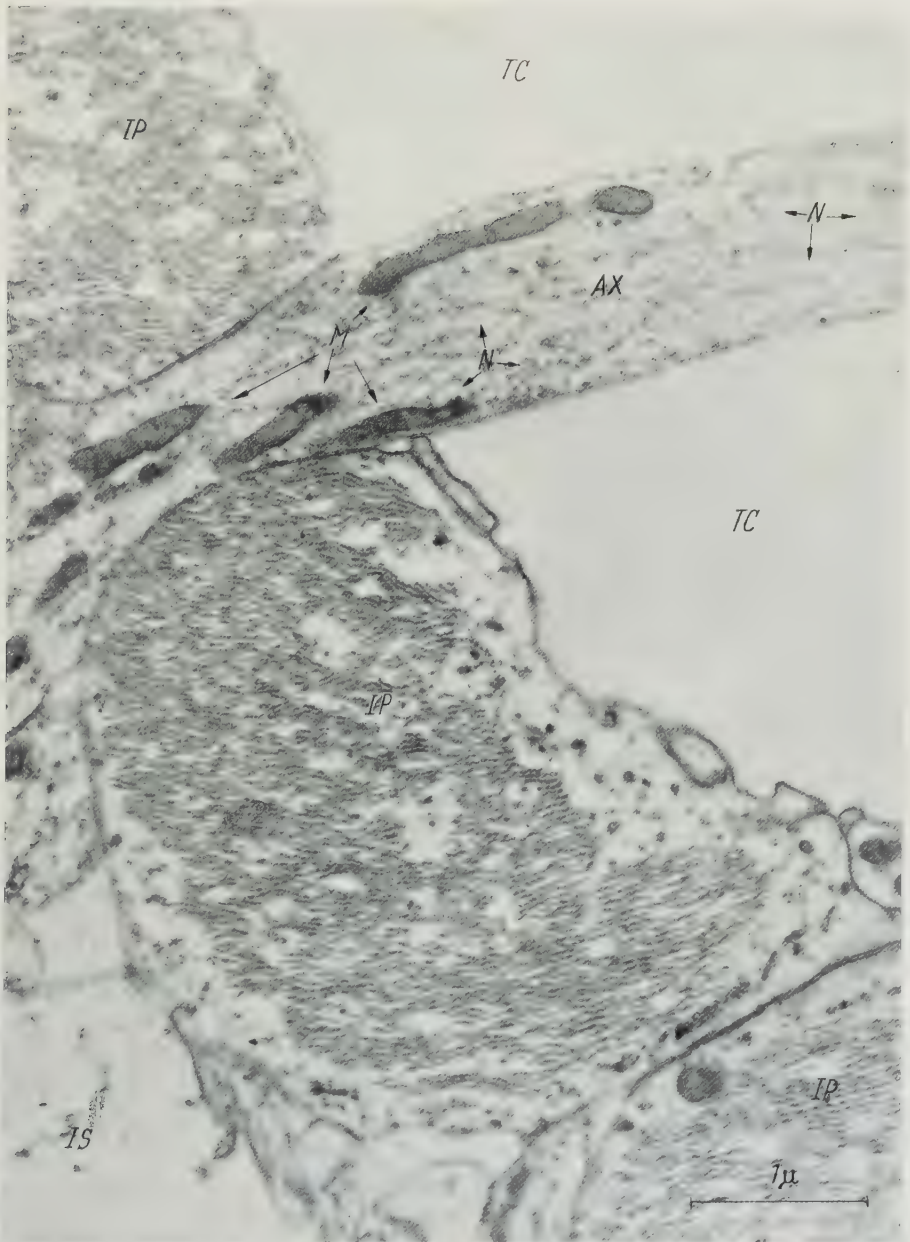


Fig. 15. Slightly oblique cross section of the inner pillar cell bodies (*IP*): the facet further from the modiolus constitutes the median wall of Corti's tunnel (*TC*); the facet facing the modiolus is connected with the inner supporting cells (*IS*), while the other two facets are connected with the corresponding facets of adjacent inner pillar cells (middle whorl). An axon (*AX*) with mitochondria (*M*) and neurofilaments (*N*) can be observed entering into Corti's tunnel, passing between two inner pillar cells, without any sheath. Enlargement 22500 \times

distinguishes two types of endings: "granulated nerve endings", with a large quantities of vesicles, and "agranulated nerve endings", with few vesicles.

Similar pictures were also observed in my material, and a distinct difference was noted between the o.h.c. and the i.h.c. In the former practically only the first type of nerve endings were seen, whereas in the latter endings of the second type were also noted, although very few in number and in the side portions of the cell only.

The pillar cells

Form, site and connections

The pillar cells of CORTI's tunnel are supporting cells forming the main support for the whole epithelium of CORTI's organ. Submicroscopic investigations have in the first place substantiated the data on form, site and connections provided by the light microscope. Furthermore, the following details could be revealed:

a) The base of the pillar cells, which rests on the basilar membrane (Fig. 18), is separated from this membrane by a distinct boundary membrane (ENGSTRÖM 1955).

b) The body of the outer pillar cells is cylindrical. It is situated between NUEL's space and CORTI's tunnel and connected with the 1st series of DEITERS' cells in the portion near the base of the pillar cell (Fig. 18). The remaining portion of the cell is entirely surrounded by liquid, as the bodies of the outer pillar cells proceed free of any reciprocal connection (Fig. 3).

The body of the inner pillar cells is prismatic (Fig. 3, 15 and 17b). The facet further from the modiolus¹ constitutes the median wall of CORTI's tunnel and is therefore free (Fig. 15). The facets towards caecum cupolare and the caecum vestibuli are connected with the corresponding faces of the adjacent inner pillar cells (Fig. 15), while the facet facing the modiolus is connected with the inner supporting cells and, to a small extent, also with the i.h.c. (Fig. 3 and 15).

It can therefore be seen that CORTI's tunnel, on the side facing the modiolus, is closed by a wall formed by a continuous row of cells (the inner pillar cells), whereas on the side facing the o.h.c. the wall, formed by the outer pillar cells, is interrupted. Wide intercellular clefts provide a communication between CORTI's tunnel and NUEL's space (Fig. 3).

c) With regard to connections between the pillar cell heads and the reticular membrane, it appears that the head of the inner pillar cells ends with a rectangular, laminar process extending right up to and contacting the cuticle of the 1st row of o.h.c. From the head of the outer pillar cells, above the covering mentioned, a laminar process likewise proceeds in an excentric direction, passing through the o.h.c. of the 1st series, narrowing considerably and finally broadening at the end into a half-hexagon with 3 sides. The centre side is in contact with the 2nd series o.h.c. cuticle, while the other two are in contact with the phalanges of 1st series of DEITERS' cells (Fig. 5b and 25).

Structure

There is a filamentous skeleton, which had already evidenced in light microscope observations. It is found in a cytoplasm which is concentrated at the base of the cell, where the nucleus is found.

¹ After BAIRATI (1960) I often use "further from the modiolus" instead of "outer" and "facing the modiolus" instead of "inner" because these terms express better the actual relationships between the components of the cochlea.

The cytoplasm has a poorly developed endoplasmic reticulum. It contains few mitochondria and is outlined by a boundary membrane which appears separated by a space of about 150 \AA from the boundary membrane of the adjacent elements. The contact surface between the heads (Fig. 17b), the lower part nearest the basilar membrane (Fig. 18) and the end of the process towards the o.h.c. (Fig. 5b) present a general thickening of the cellular membrane with a finely granular appearance. Here the filamentous structures terminate. Between the heads there are areas of closer aggregation similar to those found in the terminal bars (Fig. 17b).

The most important data revealed by submicroscopic investigations concern the filamentous structure, the organisational details and, in part, the nature of which have been defined.

1. It is composed of submicroscopic individual filaments, with no anastomoses between them, found in varying number in the inner and the outer pillar cells (see Table 2), and having a diameter of about 215 \AA (Fig. 16). This

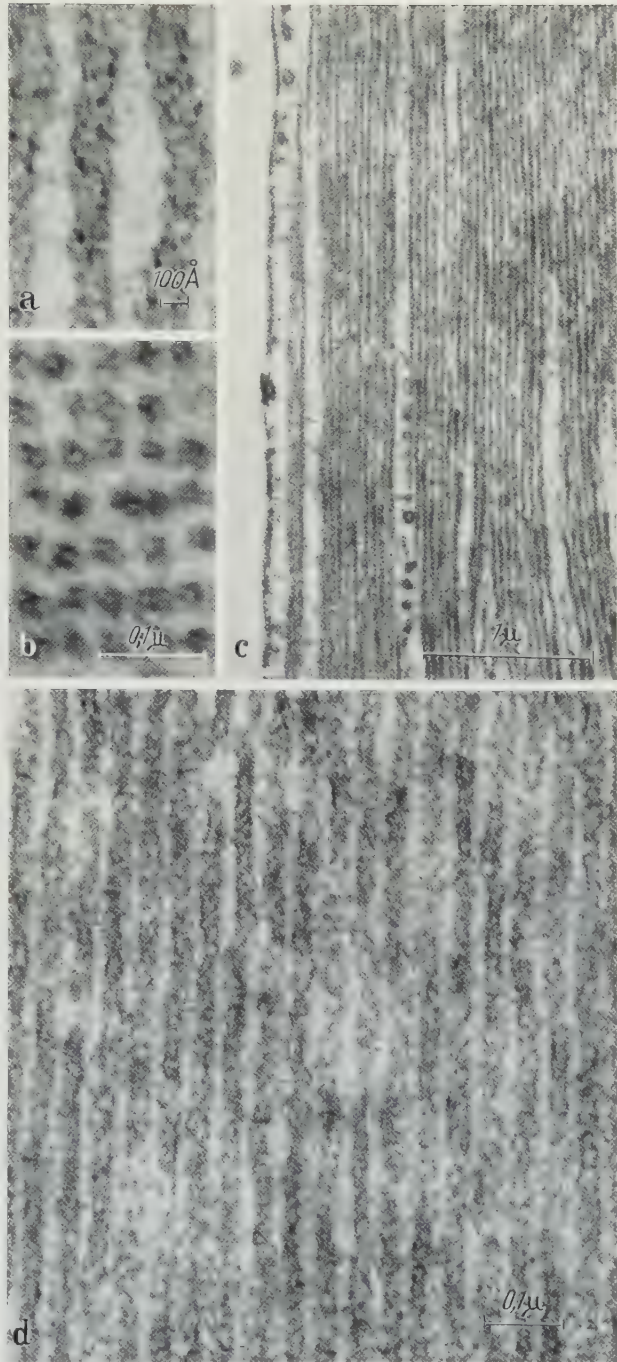


Fig. 16 a—d. Pillar cell filaments at various enlargements after contrast staining with uranyl acetate; a $250\,000\times$; b $135\,000\times$; c $21\,000$ and d $100\,000\times$. In a, c and d the filaments are cut lengthwise; in b they are cut crosswise. The latter image suggests a tubular structure, but this is a technical artifact due to the stain depositing for preference on the edges of filaments

value, computed as a mean from the measurements taken on highly enlarged preparations, substantially corroborates the values found in *Cavia cobaya* by ENGSTRÖM and WERSÄLL (200 Å, 1953; 130–140 Å, 1958) and SPOENDLIN (150 Å, 1957).

An attempt was made by examining highly enlarged filaments to find out whether they consist of a number of smaller structures, as has been suggested from X-ray diffractographic investigation of other protofilaments. No results were achieved. Both the osmic and the uranyl acetate staining methods produced non-homogeneous images, occasionally slightly granulous, formed by an alternation, though without real periodicity, of clearer parts and highly opaque ones (Fig. 16a and b). In some cases the image suggests a tubular structure (Fig. 16b)

but this is a technical artefact, not always apparent, due to the stain depositing for preference on the edges of the filament.

Table 2. *Number of filaments contained in pillar cells* (counts made at the level of the pillar cell body)

30 cells in each whorl have been counted belonging to 7 different animals

	Inner pillar cells	Outer pillar cells
Apical whorl	2339 ± 79	1693 ± 26
Middle whorl	2997 ± 25	3746 ± 127
Basal whorl	3125 ± 32	3838 ± 75

2. The filaments are of the same length as the pillar cells and therefore run from the basal surface to the head. Their ends penetrate into areas of dense, highly electron-opaque material which may be considered as thickenings of the boundary membrane. The image closely resembles that of the endings of tonofilaments in the desmosomes (Fig. 18).

3. The filaments always follow exactly the same pattern in the various parts of the pillar cells:

a) In the body of the outer pillar cells, the filaments are straight and gathered in a bundle almost in the centre (Fig. 14). The filaments fill a great part of the cell and in cross sections they are found to be arranged compactly forming a very regular cuboid lattice (Fig. 17a). This lattice has a period of 420 Å. There are 570 filaments per μ^2 in the areas of greatest compactness.

In the body of the inner pillar cells the filaments are less compact and more wavy (Fig. 17b).

b) In the outer as well in the inner pillar cells the bundle of filaments, as it enters the base of the pillar cell, spreads fanwise across the part of the cell further from the CORTI's tunnel axis (Fig. 18). Consequently, the part of the cell containing the nucleus is closer to the tunnel and formed, as has been evidenced by light microscope investigations, of non-filamentous cytoplasm.

In the fan just mentioned various directions can be identified in the course of the filaments (Fig. 18 and 24). The filaments closest to the nucleus form a loop with its concave portion facing CORTI's tunnel. They enter the boundary membrane at an angle of 130° opening towards the tunnel. Proceeding excentrically in respect of CORTI's tunnel there then comes a smaller system of filaments which likewise enters the boundary membrane, but at an angle of 90°. Lastly, there is a strong bundle entering the basal boundary membrane at an angle of 30°. The angle is even smaller for those filaments which penetrate close by the excentric side of the pillar cell (Fig. 18).

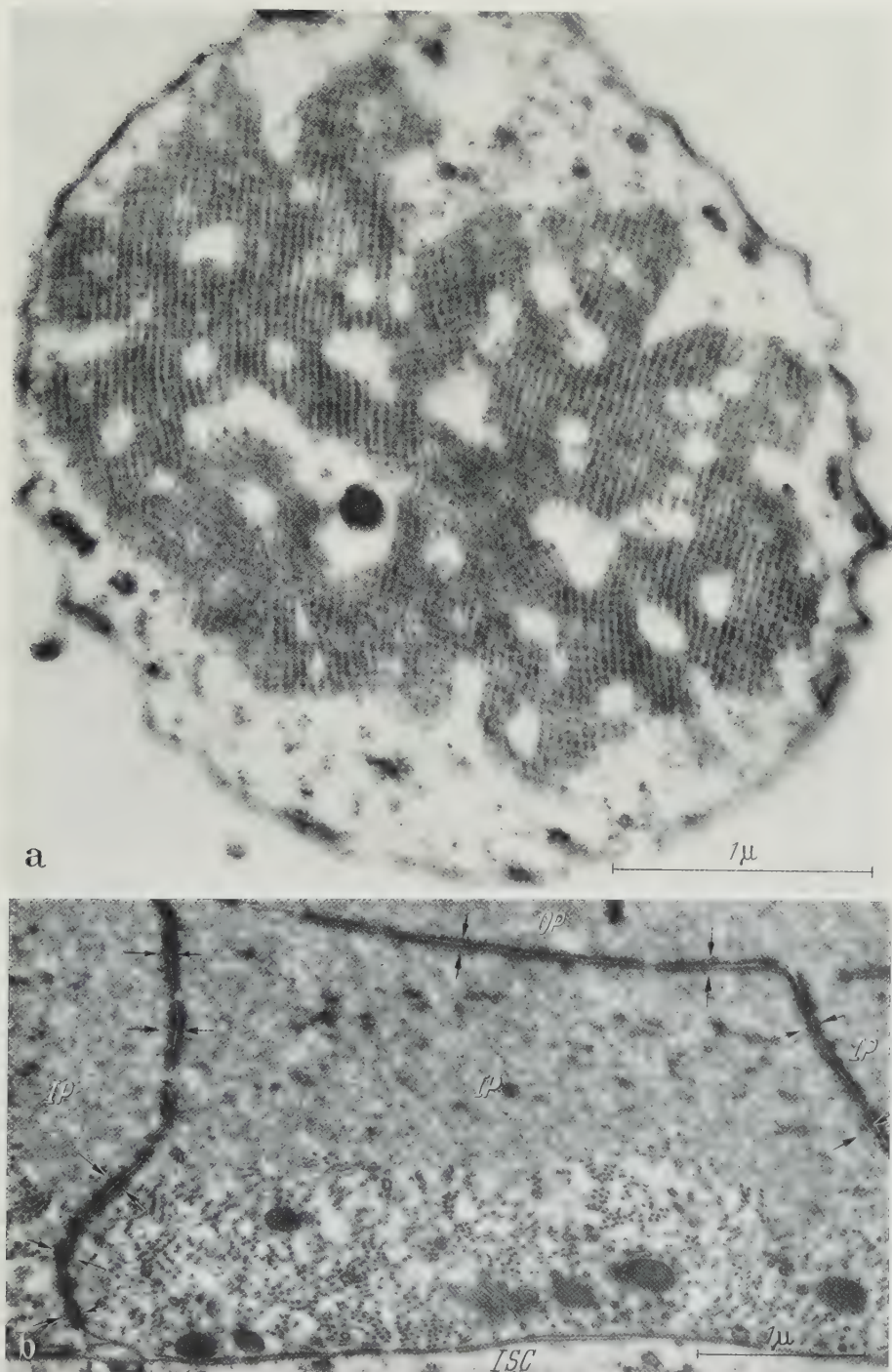


Fig. 17. a Cross section of an outer pillar cell body of the middle whorl showing the filaments arranged compactly with appreciably cuboid symmetry; enlargement 35000 \times ; b cross section of an inner pillar cell body of the middle whorl near the head. The filaments are less compact. Between the pillar cells areas of thickening of the boundary membrane can be seen, marked with arrows. *IP* inner pillar cell; *OP* outer pillar cell; *ISC* inner supporting cell. Enlargement 22000 \times .

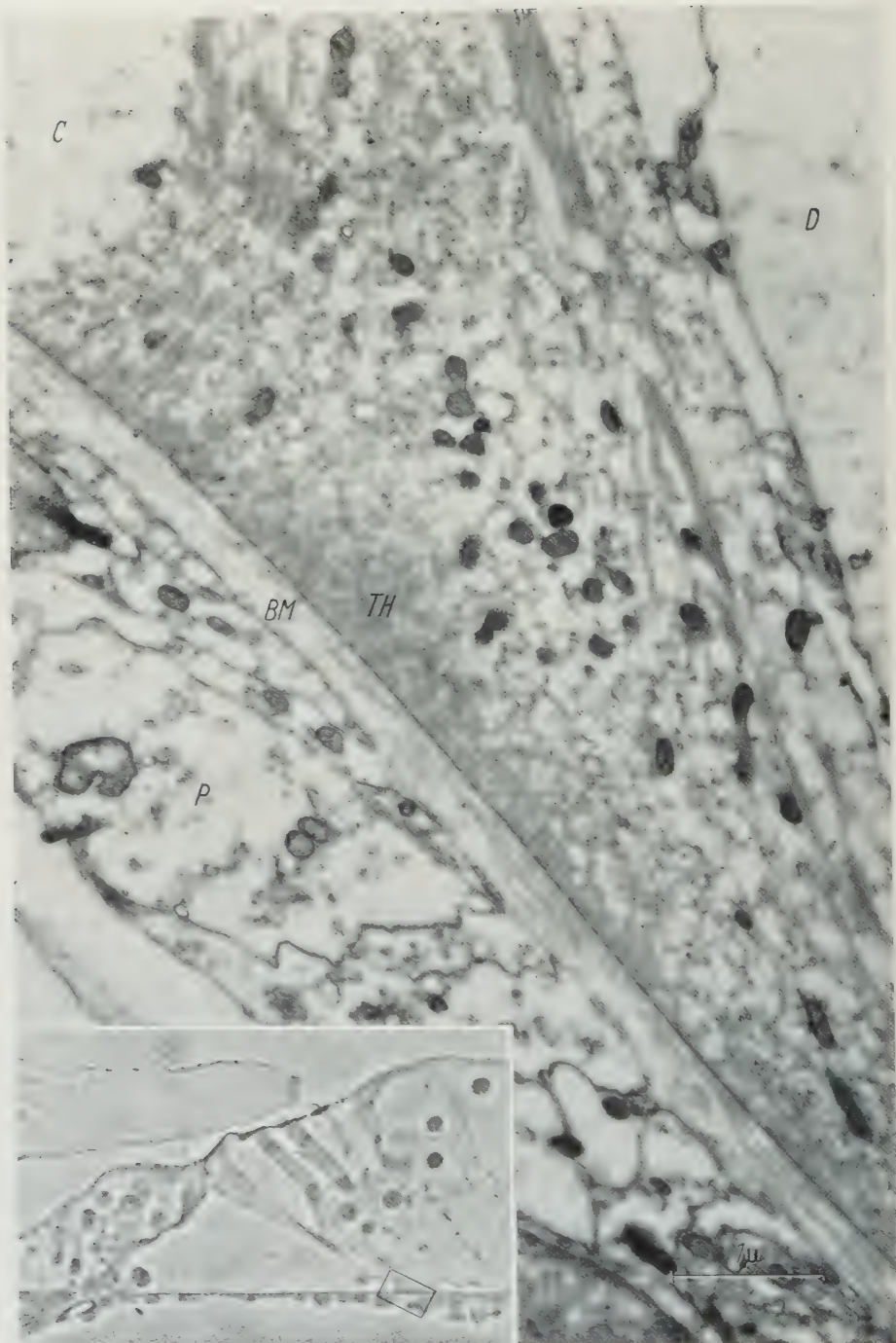


Fig. 18. Base of an outer pillar cell of the apical whorl, standing on the basilar membrane (*BM*). The bundle of filaments spreads fanwise. On left the filaments enter the boundary membrane at an angle of 130° , in the middle the angle is 90° , while on right there is a bundle entering the basal boundary membrane at an angle of 30° . *C* filamentless cytoplasm; *D* 1st row DEITERS' cell; *TH* thickening of the boundary membrane; *P* cell of perilymphatic space. Enlargement $20000\times$. In the inset, organ of CORTI by phase contrast ($430\times$). The outlined area indicates the zone examined with the electron microscope

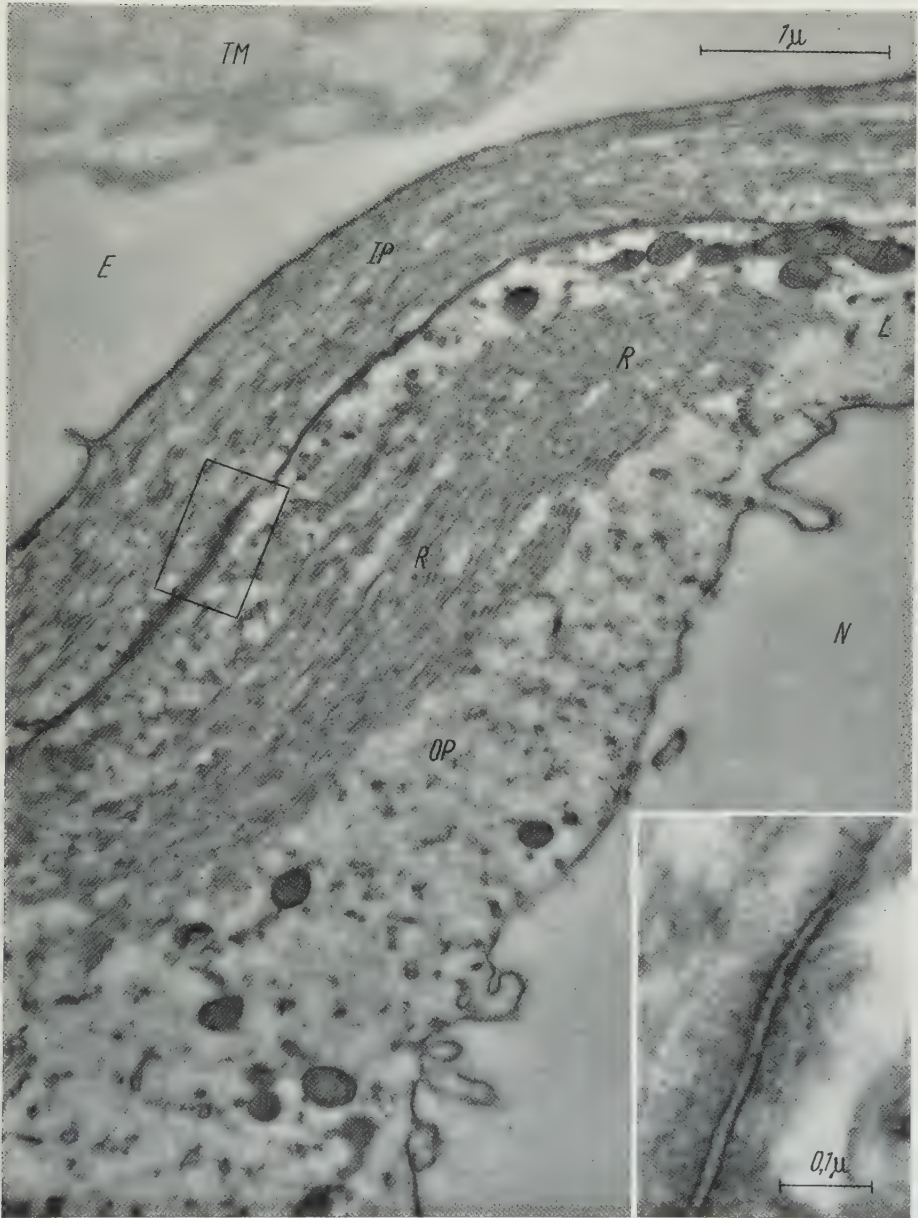


Fig. 19. The laminar process of the inner pillar cell head (*IP*) covers the head of the outer pillar cell (*OP*); in the latter, a well defined bundle of filaments can be seen passing inside the laminar process (*L*) of the outer pillar cell head (recurring bundle *R*). *TM* tectorial membrane; *E* endolymphatic space; *N* NUEL's space. Between the pillar cell heads, areas of thickening of the boundary membrane can be seen. The outlined area indicates one of these zone (apical whorl). Enlargement 24000 \times . In the inset a more highly enlarged image of the outlined area (120000 \times)

c) The filaments behave differently at the head of the outer and of the inner pillar cells (Fig. 24). In the latter, they follow a curve the concavity of which faces down and outwards. They continue on into the laminar process partly

covering the head of the outer pillar cell and end in the thicker portion of the boundary membrane which touches the cuticle of the 1st series of o.h.c. (Fig. 19).

In the head of the outer pillar cell the bundle of filaments splits up into small groups spreading fanlike and ending along the surface where they contact the inner pillar cell. A well defined group of filaments passes inside the laminar process and ends, like the former one, in the thicker portion touching the cuticle of the 2nd series o.h.c. (recurring bundle) (Fig. 19, 5b and 24).

Remarks on the nature of the filaments

For technical reasons it was not possible to obtain sufficient quantities of material to make chemical analyses or diffractographic investigations. I therefore endeavoured to make up for this by polarised light investigations, with some topochemical tests using acids, alkalis, various fixatives and enzymes.

The pillar cells filaments proved to have an intrinsic positive birefringence, non-reversible with phenol, easily attacked by proteolytic enzymes at ambient temperature, and urea-soluble. They unquestionably consist of protein material. On the whole the tests suggest that they do not belong to the collagen group proteins.

Bearing in mind that the filaments are located inside the cell and how they are connected to the boundary membrane, there are obvious analogies with the tonofilaments of the stratum spinosum of stratified squamous epithelium. The pillar cell filaments therefore seem to originate from an endocellular differentiation of a similar nature to that giving rise to the formation of the epidermal tonofilaments.

The Deiters' cells

The DEITERS' cells are supporting cells with very similar structure to the pillar cells, from which they differ mainly in their shape which is determined by the peculiar way they are connected with the o.h.c.

Form, site and connections

Electron microscope investigations have provided the following results.

a) While the body of the DEITERS' cells is shaped like a parallelepiped and is connected with the neighbouring cells by simple contact of the boundary membrane, the neck continues in a straight line, free of all contact, through the spaces between the o.h.c., travelling obliquely towards the caecum cupolare (Fig. 20).

b) The cup-shaped part ends with a thin sheath (about $0.1\ \mu$ thick) enveloping the basal part of the o.h.c. perinuclear zone (Fig. 20).

c) The phalanx, which has been described in classical histological findings as a flat process which looks like an 8, appears under the electron microscope as 2 hexagons joined by one side: 6 of the 10 sides are in contact with the cuticle of 4 neighbouring o.h.c., while the other 4 are connected to the 4 neighbouring phalanges (Fig. 25). The underside of the phalanx is not flat, as it has a peduncle which at the bottom narrows into the slender portion (neck) which continues on (Fig. 21a).

In sections perpendicular to the free surface it is therefore shaped like a triangle with the base at the top and the apex at the bottom, continuing into the neck (Fig. 21a). The thickness of the phalanx is about $0.7\text{--}1\ \mu$.

d) The DEITERS' cells of the series further from the modiolus have peculiar, quite different features (as already shown by ENGSTRÖM and WERSÄLL, 1958). Their narrow portion runs close up against the modiolar face of the 1st row of HENSEN's cells. Their phalanx is excentrically joined to the free surface of these cells, thus forming a connection between the HENSEN's cells and the reticular membrane.

Structure

The boundary membrane of DEITERS' cells is formed by a continuous, homogeneous, rather wavy layer separated from the boundary membrane of the adjacent cells by a space of about 150 Å. The portion in contact with the basilar membrane is flat.

At the points where the bundle of filaments commences and ends, the boundary membrane thickens considerably in a very similar way to that described for the pillar cells boundary membrane.

The part of the cell body nearest to the basilar membrane (Fig. 21 b) consists of a hyaloplasm which looks like minute flakes, with very

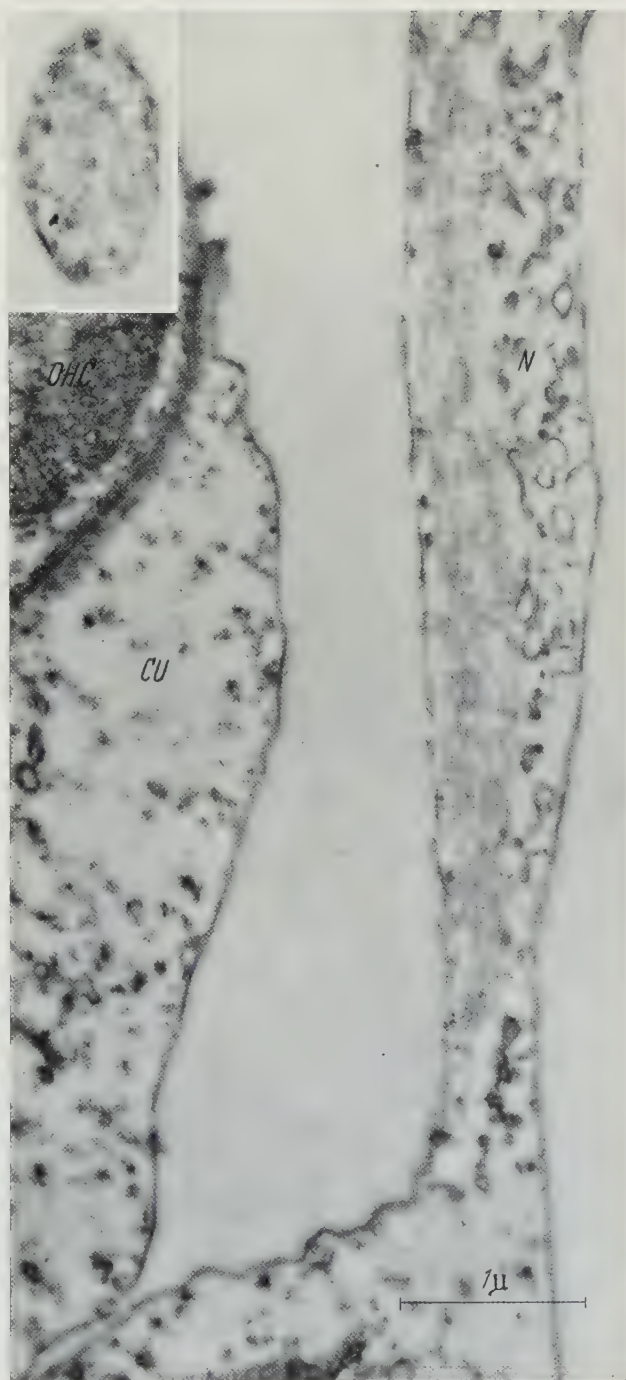


Fig. 20. Left, the cup-shaped part of a DEITERS' cell (CU) connected to an outer hair cell (OHC). Right, the neck (N) of the same DEITERS' cell containing a small bundle of filaments, some vesicles and small tubules (apical whorl). In the inset slightly oblique section of a DEITERS' cell neck. Enlargement 24000 ×

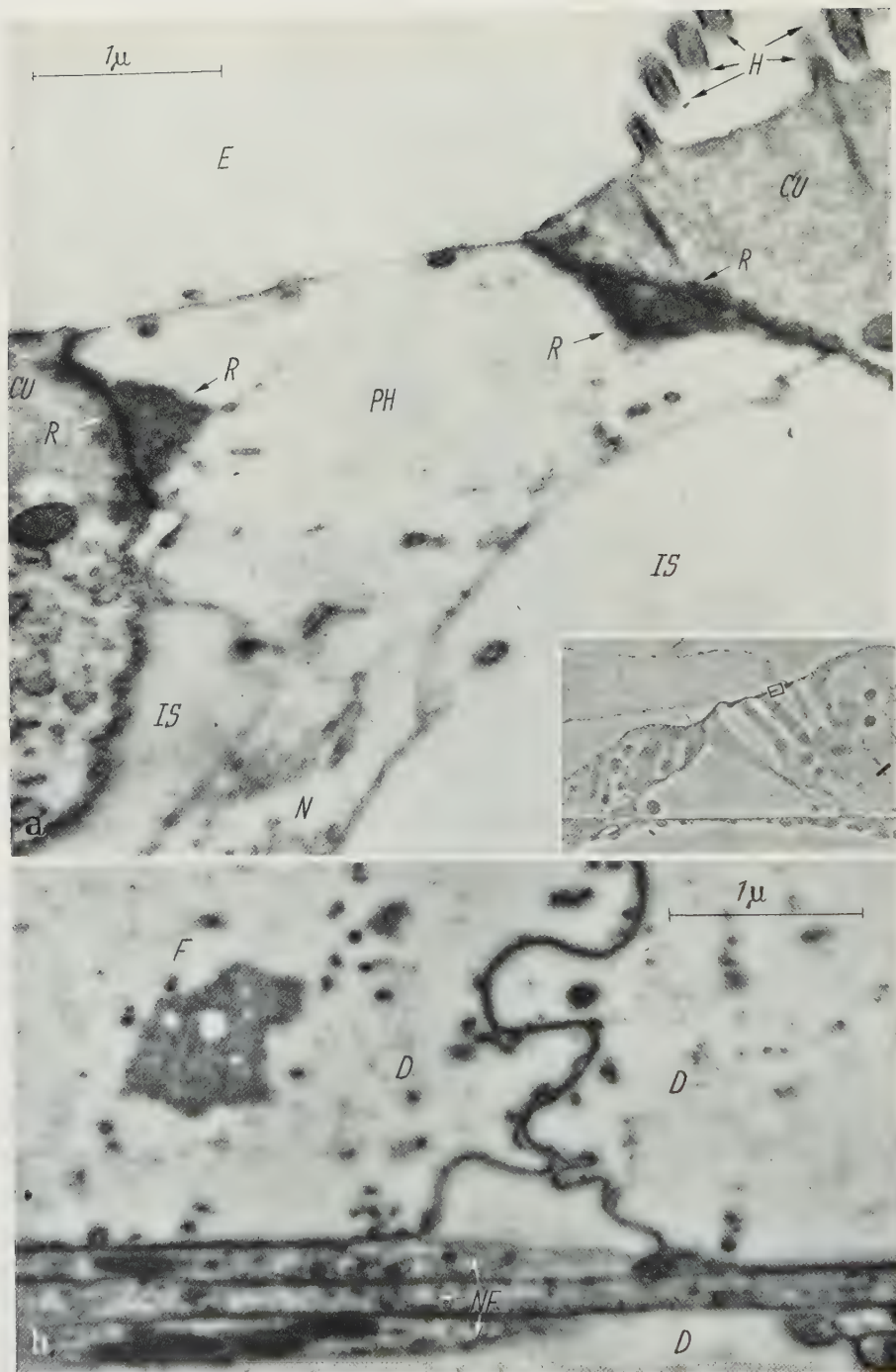


Fig. 21. a The upper part of the neck (N) and the phalanx (PH) of a DEITERS' cell between the cuticle (CU) of two outer hair cells of the apical whorl; E endolymphatic space; H hairs of an outer hair cell; IS intercellular space; R highly electron-opaque material reinforcing the boundary membrane of the phalanx and of the outer hair cell cuticle at the points of reciprocal connection. b Cross section of two DEITERS' cell bodies (D) of the middle whorl; F the bundle of filaments showing a very compact arrangement; NF 3 small axons without any sheath passing between the 2nd series DEITERS' cells and those of the 3rd series. Enlargement 24000 \times . In the inset organ of CORTI examined by phase contrast (330 \times). The outlined area indicates the zone examined by the electron microscope in a, while the line indicates the level of the cross section in b

few vesicles and few mitochondria, without any well developed endoplasmic reticulum. Close to the cup-shaped part the structure is considerably more complex, with a greater number of mitochondria, a vesicular type of endoplasmic reticulum with some series of ergastoplasmatic membranes (Fig. 11b).

The filamentous structure of the cell is composed of a band of about 600 filaments, submicroscopically identical with those shown in the pillar cells. This band originates at the base of the cell near the boundary membrane as a fan of filaments which immediately join up in a compact band (Fig. 21b) that traverses the whole height of the cell body. At the level of the cup-shaped part, part of the filaments ends, expanding and entering the boundary membrane. The others continue into the neck.

The slender part, or neck, is formed practically exclusively by the bundle of filaments, which is enveloped by a thin sheath of cytoplasmic material (Fig. 20). There are usually no mitochondria in this region, but sometimes numerous vesicles and small tubules can be observed.

The phalanx is not a homogeneous cuticle-type structure, but formed by a thin disc of cytoplasm having its free surface covered by a boundary membrane with a few microvilli (Fig. 21a).

The inside of the phalanx is taken up by hyaloplasm which can easily be extracted with appropriate techniques. There are usually no mitochondria. The phalanx contains the filaments coming from the neck of the cell, and which disappear as they reach the opaque material in contact with the o.h.c. cuticle. Around the contour of the phalanx, at the points of connection with the cuticle of the o.h.c., the boundary membrane is reinforced by highly electron-opaque material (Fig. 21a). On the other hand, at the points of connection with the neighbouring phalanges there is far less reinforcing material.

From these data and the studies previously mentioned on the boundary membrane of the hair cells cuticle, a fairly clear picture can be given of the structure of the so called reticular membrane (Fig. 25).

The dark lines visible under the light microscope at the dividing wall between the cells of the CORTI's organ are not made of intercellular cementitious material, but by the bonding of 2 asymmetrical halves of opaque intracellular material belonging to the boundary membranes of the cells in contact (the more extensive part belongs to the phalanges).

In other words the phalanges are connected with the o.h.c. cuticle in much the same way as the terminal bars of the epithelial cells (FAWCETT 1958). The analogy likewise holds good for the way the phalanges are connected one to the other, even though there is less reinforcing material.

Inner spiral sulcus cells, inner supporting cells, Hensen's cells, Böttcher's cells, Claudius' cells and outer spiral sulcus cells

Form, site and connections

Electron microscope investigations have corroborated the general data provided by light microscopy.

From the inner spiral sulcus up to the pillar cells there is a continuous arrangement of irregular prismatic cells of increasing height (inner spiral sulcus cells and inner supporting cells).

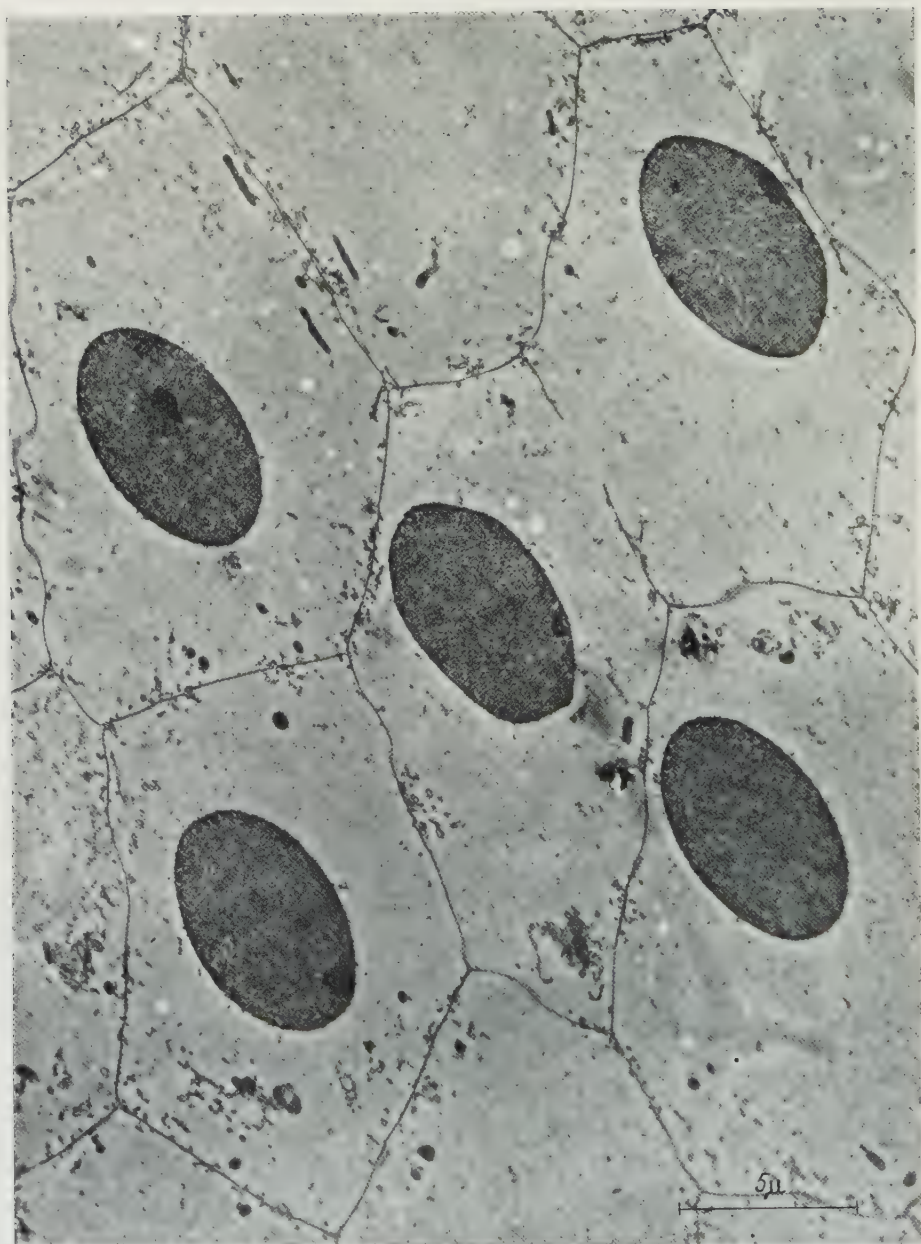


Fig. 22. CLAUDIUS' cells cut cross-wise. They are likewise extremely regular hexagonal prisms (basal whorl). Enlargement 4500 \times

As already stated (see i.h.c.) the inner supporting cells are arranged in close contact with the i.h.c. and there is no free space between. The inner supporting cells between the i.h.c. and the inner pillar cells are shaped like very regular triangular prisms (Fig. 3).

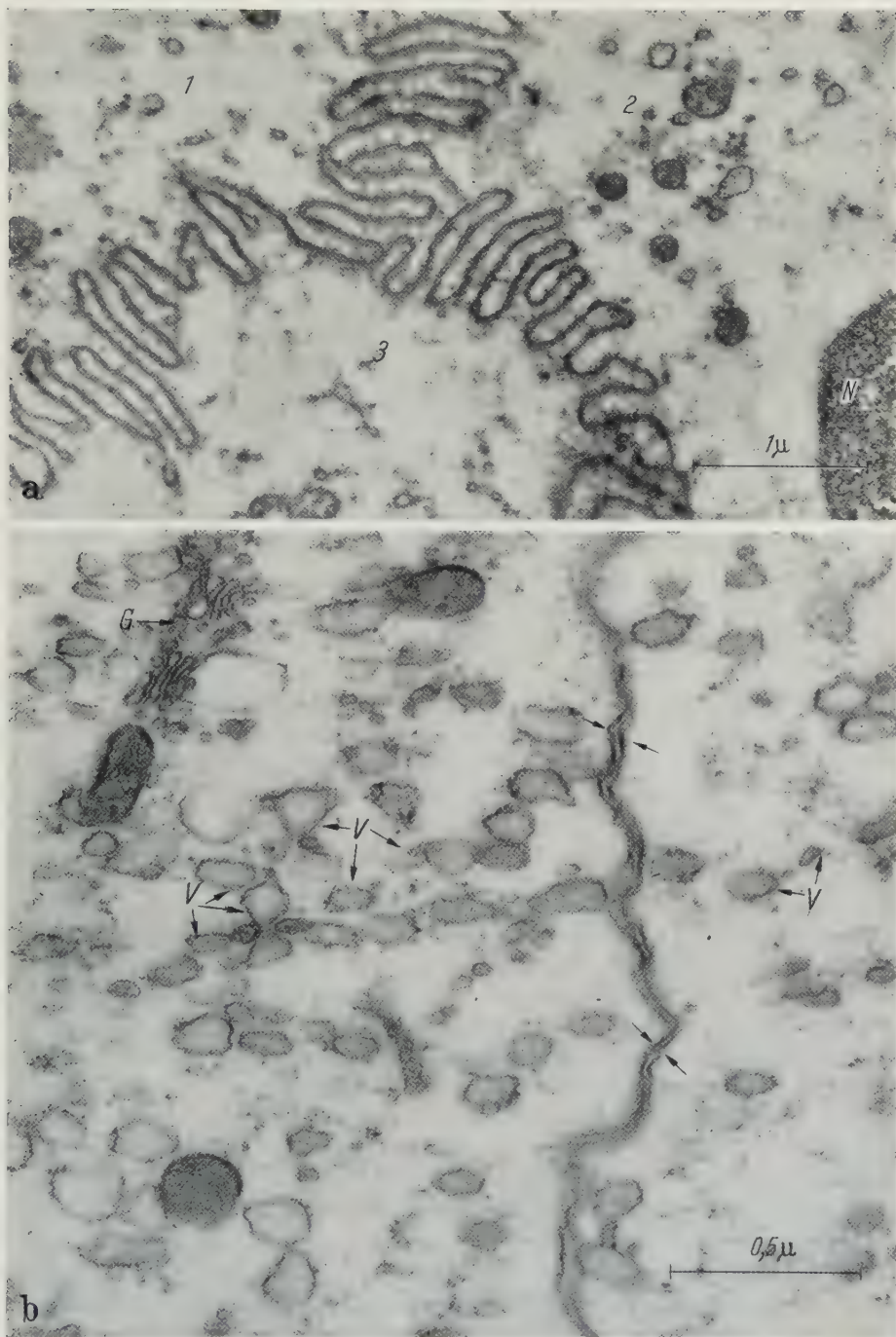


Fig. 23. a 3 outer sulcus cells (1, 2, 3) with complicated indents of the boundary membrane (basal whorl). *N* nucleus of an outer sulcus cell. Enlargement 22500 \times . b Shows the aspect of the hyaloplasm of two HENSEN'S cells containing large vesicles (*V*) and canaliculi; *G* GOLGI'S field. The arrows indicate the boundary membrane of two neighbouring cells. Enlargement 48000 \times

HENSEN'S cells can be compared with large, very high hexagonal prisms. Their height varies in the different whorls. In the apical whorl the HENSEN'S cells, placed further from the modiolus, were found, in the rat, to constitute a dome-shaped boss projecting into the endolymph much more than the reticular membrane (Fig. 1).

The CLAUDIUS' cells, definitely shorter, follow immediately on the previous ones with a sharp difference, and are likewise extremely regular hexagonal prisms (Fig. 22). The cells become still shorter at the level of the outer spiral sulcus.

Structure

All these cells are built up in the same way so that one description can be given for all.

They have a boundary membrane composed of an osmiophilic uniformly thick layer, without reinforcing material, except in the inner supporting cells, where there is a thickening at the points of contact with the i.h.c. cuticle. The boundary membrane is flat along the parts touching the basilar membrane. It follows a course which is sometimes straight (Fig. 23 b), sometimes winding with complicated indentations where the cells touch (BUTCHER'S cells, outer sulcus cells, Fig. 23 a).

On the free surface it has numerous finger-shaped expansions (microvilli).

When highly enlarged, it appears, at the point where the microvilli occur, formed by three layers of similar size and characteristics to those already described in the membrane covering the cuticle and cilia of the hair cells.

The hyaloplasm is highly electron-transparent. There are few but fairly large vesicles and canaliculi of the endoplasmic reticulum. There are few, small mitochondria. Under the conditions of my observations, the nucleus did not appear to have any noteworthy structural characteristics.

Discussion and interpretation

The organ of CORTI, despite its high degree of differentiation, unquestionably retains the organisational characteristics of an epithelium.

This statement is borne out by results revealed under the electron microscope. In particular, by the form of the cells, the way in which they are connected (by mere contact of the boundary membranes or with terminal bars), the manner of surface endings (cuticles, microvilli, hairs) and lastly by the filamentous content of the supporting cells which has similar characteristics to tonofibrillary structures.

Against this general background, two features emerge as peculiar to this epithelium.

The first is that there are ample intercellular spaces full of liquid. The most important, and already known, are CORTI'S tunnel, NUEL'S space and outer tunnel. To these must be added the spaces between the o.h.c. which have been revealed by electron microscopy (Fig. 3). These spaces communicate with each other as well as with NUEL'S space, CORTI'S tunnel and outer tunnel. There actually is a single large lacuna (bounded at the top by the reticular membrane, at the bottom by the upper face of the bodies of DEITERS' cells, further from the modiolus by HENSEN'S cells and lastly towards the modiolus by the inner pillar cells) in

which the outer pillar cells, the o.h.c. and the slender portion of DEITERS' cells are arranged at regular intervals.

The second feature is the distinct differentiation of the CORTI's organ cells into supporting elements and sensory elements which obviously have different functions.

Morphofunctional characteristics of the supporting cells

The supporting cells give stability to the entire epithelium of CORTI's organ. This function is brought about by particular filamentous endocellular structures having function similar to those of the tonofilaments, and by the close way in

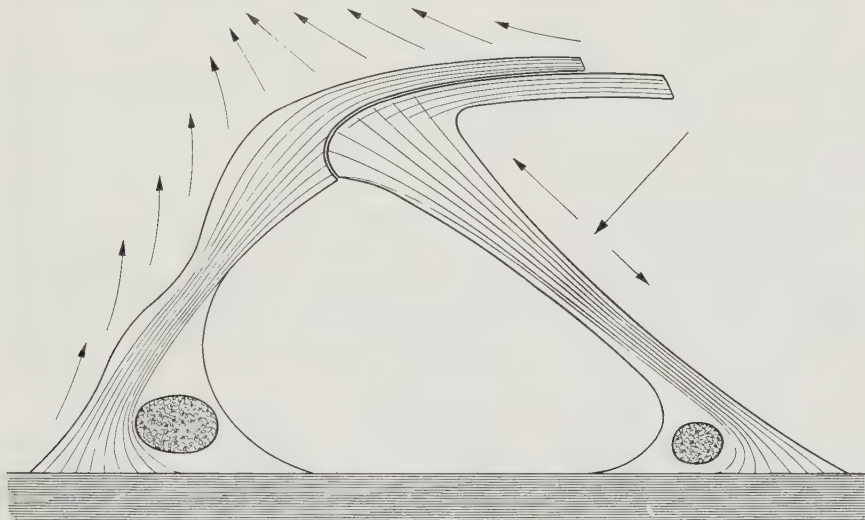


Fig. 24. Schematic drawing showing an evident correlation between architecture and manner of stimulation in CORTI's pillar cells

which the supporting cells are connected with one another, with the sensory cells and with the basilar membrane.

The lower part of the supporting cells is fixed to the basilar membrane by the boundary membrane, and the filaments inside of the supporting cells are not connected with those in the basilar membrane.

The upper portion of these cells is provided with peripheral thickenings which, joined together and to thickenings contouring the o.h.c. cuticle, form the so-called reticular membrane.

The filamentous structures are arranged regularly in the space between the basilar and the reticular membrane, following a constant, well defined pattern. Their task is to keep this space as far as possible unchanged, preventing abnormal from pressure bearing on the sensory cells. In this respect, a distinction must be drawn between the function of the DEITERS' cells and those of CORTI's tunnel.

The DEITERS' cells are a quasi-capillary supporting system composed of numerous ties all running in the same direction towards the caecum cupulare. Referring to the method of stimulation of CORTI's organ according to v. BÉKÉSY's theory of longitudinal waves (1952, 1953a, 1953b, 1956, 1959), it appears that these ties run in the direction of any possible stretching that might be caused

by waves propagating along the cochlear duct. It is therefore obvious that the lines of stress coincide with the orientation of the structures. This correlation between architecture and manner of stress is even more obvious in CORTI's tunnel,

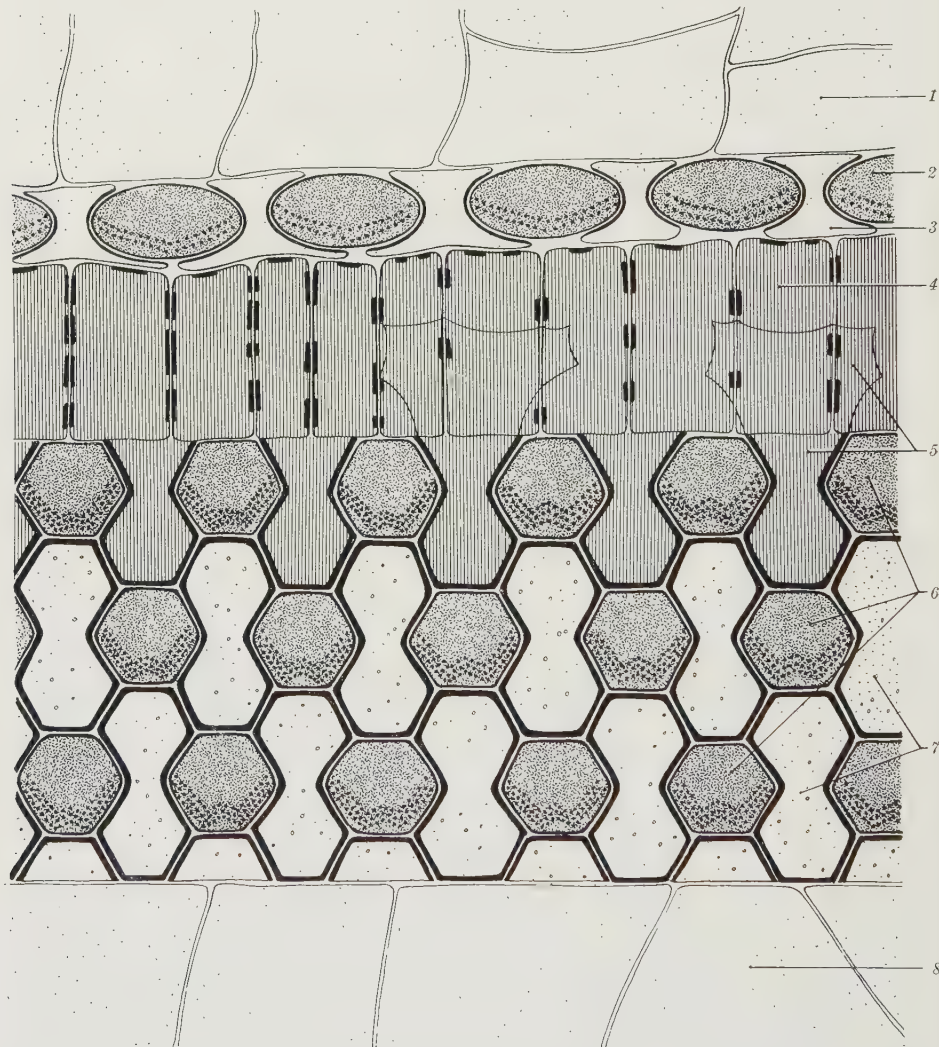


Fig. 25. Schematic drawing of the structure of the reticular membrane. The picture shows that the reticular membrane is not made of intercellular cementitious material, but by the bonding of 2 asymmetrical halves of opaque material belonging to the boundary membranes of the cells in contact. In this picture the outer hair cells cuticle is drawn as a complete hexagon, while in fact it does not occupy entirely the apical part of the outer hair cell. From top to bottom inner supporting cells (1) inner hair cell cuticles (2), inner supporting cells (3), inner pillar cell heads (4), outer pillar cell heads (5), outer hair cell cuticles (6), DEITERS' cell phalanges (7), HENSEN's cell (8)

which can be compared with an asymmetrical truss with the load mainly on the larger side, represented by the outer pillar cells, carrying the load of the o.h.c. and HENSEN's cells which constitute the major part of CORTI's organ. The outer pillar cells are stronger and more tilted than the inner pillar cells, to which they

are connected in such a fashion as to facilitate absorption of the thrust. And the orientation of the filaments inside the pillar cells tallies with this mode of directional load.

a) At the foot of the pillar cells the filaments expand considerably along the surface following two main directions, one towards CORTI's tunnel, the other in the opposite direction, thus offering good distribution of the load over a sufficiently large part of basilar membrane (Fig. 24).

At the head of the inner pillar cells the filaments form an arch extending to the cuticle of the 1st series of o.h.c., with the concave surface facing the head of the outer pillar cells, which are thus efficiently braced (Fig. 19 and 24). In the head of the outer pillar cells most of the filaments tail off fan-wise along the surface of contact with the inner pillar cells. It should be remarked, however, that one compact bundle of filaments follows a recurrent course excentrically towards and up to the cuticle of the 2nd series of o.h.c. (Fig. 5b and 24).

In this manner the thrust bearing on the outer pillar cells, which tends to lessen the distance between the reticular and the basilar membrane is transmitted directly to the latter, and partly absorbed by the inner pillar cells, which in turn discharge it to the basilar membrane and, in part, convert it into tractive effort which bears on the reticular membrane in the opposite direction to the thrust, that is, with a tendency to widen the distance between the reticular and the basilar membrane (Fig. 24). The recurrent bundle shown in the outer pillar cells likewise exercises a tractive effort on the reticular membrane.

As can be seen from Fig. 24, the mechanical value of the arrangement illustrated is that it absorbs the thrust bearing on the reticular membrane and converts it into tractive effort which tends to raise the reticular membrane afresh.

Morphofunctional features of the auditory receptors

It is commonly held that the hair cells are secondary sensory cells which, when stimulated by the mechanical vibrational energy of sound waves originate centripetal nerve impulses.

This interpretation, which is broadly correct, has not yet been corroborated by unquestionable proof, i.e. the demonstration of which anatomical structures could convert a mechanical impulse into a nerve impulse.

Physiological investigations have already shown what are the dynamic phenomena generated by the differentiated receptors. Essentially, a nerve signal is sent out pursuant to stimulation caused by even minimum quantities of energy, so that the receptor can be compared with an electrical transformer or even amplifier, or a system charged with unstable potential energy, in which the slightest stimulation suffices for inception of a discharge, hence the emission of a signal.

Credit must be given to current investigations on the submicroscopic organisation of receptors for having pointed to the possible anatomical bases of these phenomena.

A minute analysis of the correlation between receptor structure and functional performance has been made by SJÖSTRAND (1953) on visual receptors.

According to this author, the generation of the impulse pursuant to stimulation can be broken down into certain elementary phenomena handled by separate parts of the receptor each having different structural peculiarities.

Now, it has also been found that in auditory receptors different zones can be identified which, from our present knowledge, may be thought to perform different functions. It can be said, for instance, that the apical zone, composed of the cuticle and auditory hairs, is the device that receives the mechanical impulses generated by the hairs touching the tectorial membrane pursuant to vibration of the tectorial membrane or of the basilar membrane.

The underlying part, called the intermediate zone, well supplied with endoplasmic organoids and mitochondria and GOLGI's fields, is the zone supplying the necessary energy to convert and amplify the mechanical stimulus.

The perinuclear zone appears to handle conduction, while at the level of the receptoneural junction the impulse passes to the nerve fibre.

It should be remarked that this construction, and hence the general interpretation of receptor functioning, may be extended to other examples of receptors, whether mechanical or of other kinds, for instance, chemical. Besides the case already mentioned of the photoreceptor (SJÖSTRAND 1953, DE ROBERTIS 1956a, DE ROBERTIS and LASANSKY 1958) it appears that the olfactory receptor (DE LORENZO 1957, VAN SCHERPENBERG 1958) and the secondary sensory cells [gustatory cells (TRUJILLO-CENÓZ 1957, DE LORENZO 1958), vestibular cells (WERSÄLL, ENGSTRÖM and HJORTH 1954, WERSÄLL 1956, SMITH 1956, BAIRATI jr. and IURATO in press) and those of the lateral line organs (TRUJILLO-CENÓZ 1959)] all possess these different zones to which can be ascribed the above mentioned functional mechanisms.

BAIRATI (1960) rightly observed that all the primary and secondary sensory cell receptors have a common constructional pattern. Only their apical zone, designed to receive the various kinds of energy, presents distinct constructional peculiarities, very probably correlated with the characteristics of the energy for which the receptor has been differentiated.

This interpretation would appear to be corroborated by the fact that the hair cells, the vestibular cells and the cells of the lateral line organs, all of which are stimulated in the same fashion (mechanical energy), have an apical receptor area of quite similar structure, whereas the structural features of the apical segment of the photoreceptor, which is stimulated by light energy, and of the gustatory and olfactory receptors which are sensitive to chemical stimulants, are different. The other areas (intermediate, perinuclear, basal) are of quite similar structure in all the various types of receptors, obviously because they handle the same problems of converting energy and conducting the impulse. It is therefore very evident that today, guided by and with the aid of submicroscopic investigations, it is possible to identify the anatomical bases of fundamental phenomena such as the generation of impulses in sensory cells.

It must nevertheless be admitted that against the background of this general and sufficiently persuasive interpretation, certain problems still remain open: for instance, that of the efferent innervation of the auditory cells. The investigations of RASMUSSEN (1942, 1946, 1953a, 1953b) on the olivocochlear bundle, of PORTMANN and co. (1953), FERNANDEZ (1951) and others on the existence of the efferent fibres poses the problem of their terminal expansions. According to ENGSTRÖM (1958) „richly granulated“ nerve-endings would point to an efferent, while those with few or no “granules” would point to an afferent. ENGSTRÖM's

hypothesis is undoubtedly attractive, but needs more definite experimental corroboration, because certain data oppose it. For example, the fact that in the o.h.c. there are almost exclusively richly granulated nerve-endings, of the efferent type, which is in contradiction with the small size of the Rasmussen bundle and other physiological data.

Other problems arise out of the comparison between i.h.c. and o.h.c. which appear physiologically alike, but yet have significantly different structures:

a) In the surface of the i.h.c. the size of the hairs is twice that of the o.h.c. where the hairs, although more numerous, are much finer.

b) In the o.h.c. the intermediate zone is far larger, and there is a system of peripheral membranes and a stratification of mitochondria on the surface not found in the i.h.c. The latter, on the other hand, possess perinuclear ergastoplasmic membranes which are lacking in the other cells.

c) Lastly, there are appreciable differences in the receptoneural junction, formed in the o.h.c. by nerve-endings well defined on the base, whereas they are more numerous and complex in the i.h.c.

It is a tempting hypothesis that these differences might lead to the generation of differently coded signals, and that the morphofunctional differences between the two types of receptor cells are similar to those between the cones and rods. But it should be remarked that probably some of the structural features may perhaps be bound up with differences in site, hence in stimulation between the two types of cell. BÉKÉSY recently (1952 and 1953b) stated that the o.h.c. are stimulated by movements of the tectorial membrane occurring radially to the modiolus, while the i.h.c. would appear to be stimulated by displacements along the cochlear duct.

But above all it is evident that the i.h.c. are completely banked on all sides by the supporting cells, which makes for a stronger mechanical receptor organ and a greater number of nerve-endings. The o.h.c., quite to the contrary, appears to be freely stretched between two points, with numerous mitochondria arranged along the boundary membrane. Since PEASE (1957) observed a similar arrangement of mitochondria in the Pacinian corpuscle as did TRUJILLO-CENÓZ (1960) in some nerve fibres, the hypothesis may be advanced that this arrangement facilitates conduction of the impulse along the hair cell.

It is obvious that only minute physiological investigations, such as undertaken by V. BÉKÉSY (1952, 1953a, 1953b, 1956, 1959), by DAVIS (1958a, 1958b), by TASAKY (1954), by GALAMBOS (1958) will perhaps elucidate what inter-relations exist between the structural differences observed in the i.h.c. and the o.h.c. and differences, if any, in the generation and possibly the frequency of the impulses.

Summary

Investigations were performed by light and electron microscope on the submicroscopic structure of the *epithelium of CORTI's organ* in the white rat.

Morphological and structural differences between the *inner hair cells* and the *outer hair cells* are revealed.

The *inner hair cells* are closely inter-related with the inner supporting cells and have a polyhedral shape, whereas the *outer hair cells* look like cylinders and are surrounded by an intraepithelial fluid.

The structural peculiarities consist of differences in the dimensions of the hairs, in the arrangement of cytoplasmic organoids and in the aspect of the receptoneural junction. In both sensory hair cells 4 zones of different structure can be distinguished from the surface inwards: apical zone, intermediate zone, perinuclear zone and receptoneuronal junction. The functional value of these different zones is discussed and compared with what has been demonstrated in other receptors.

The *pillar cells* and the *DEITERS' cells* are supporting cells which have a filamentous skeleton, composed of submicroscopic individual filaments. These filaments have a diameter of about 215 Å and present some analogies with the tonofilaments of the stratified squamous epithelium. The filaments are arranged differently in the pillar cells and in the *DEITERS' cells*. Possible functional differences between these patterns are discussed.

The *reticular membrane* is not an extracellular cuticle. It consists of intracellular cementitious material (like the terminal bars of the epithelial cells).

The *HENSEN'S* and *CLAUDIUS' cells*, the *BÖTTCHER'S cells*, the *inner supporting cells*, the *inner* and *outer spiral sulcus cells* are regular prismatic cells with few endoplasmic organoids and without filaments.

References ^{1,2}

- BAIRATI, A.: Trattato di anatomia umana normale, vol. 3, p. 359—360. Torino: Minerva Medica 1960.
- BAIRATI, jr., A., e S. IURATO: Precisazioni sulla struttura submicroscopica dell'epitelio della cresta ampollare e della macula dell'utricolo. Atti Soc. ital. Micr. Elettr. (in press).
- BÉKÉSY, G. v.: Gross localization of the place of origin of the cochlear microphonics. J. acoust. Soc. Amer. **24**, 399—409 (1952).
- Description of some mechanical properties of the organ of Corti. J. acoust. Soc. Amer. **25**, 770—785 (1953a).
- Shearing microphonics produced by vibrations near the inner and outer hair cells. J. acoust. Soc. Amer. **25**, 786—790 (1953b).
- Current status of theories of hearing. Science **123**, 779—783 (1956).
- Neural funneling along the skin and between the inner and outer hair cells of the cochlea. J. acoust. Soc. Amer. **31**, 1236—1249 (1959).
- BORGHESEAN, E.: Aspects morphologiques, structurels et fonctionnels des cellules de Deiters. Rev. Laryng. (Bordeaux) **78**, 9—22 (1957).
- BREEMEN, V. L. v., E. ANDERSON and J. F. REGER: An attempt to determine the origin of synaptic vesicles. Exp. Cell Res. Suppl. **5**, 347—369 (1958).
- DAVIS, H.: Transmission and transduction in the cochlea. Laryngoscope (St. Louis) **68**, 359—382 (1958a).
- A mechano-electrical theory of cochlear action. Ann. Otol. (St. Louis) **67**, 789—802 (1958b).
- DOHLMAN, G., J. FARKASHIDY and F. SALONNA: Centrifugal nerve-fibres to the sensory epithelium of the vestibular labyrinth. J. Laryng. **72**, 984—991 (1958).
- ENGSTRÖM, H.: Morphological studies on the possible origin of cochlear microphonics. Rev. Laryng. (Bordeaux) **76**, 808—816 (1955).

¹ See also references in IURATO, S.: Submicroscopic structure of the membranous labyrinth. 1. The tectorial membrane. Z. Zellforsch. **51**, 105—128 (1960).

² For references prior to 1927 see KOLMER, W.: Die Entwicklung der anatomischen Kenntnisse über das Labyrinth von CORTI bis zur neuesten Zeit. In: Geschichte der Ohrenheilkunde, herausgeg. von A. POLITZER, Bd. 1, S. 27—35. Stuttgart: Ferdinand Enke 1907. — KOLMER, W.: Gehörorgan. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, herausgeg. von W. v. MÖLLENDORFF, S. 456—478. Berlin: Springer 1927.

- ENGSTRÖM, H.: On the double innervation of the sensory epithelia of the inner ear. *Acta oto-laryng.* (Stockh.) **49**, 109—118 (1958).
- , and J. WERSÄLL: The ultrastructural organisation of the organ of Corti and of the vestibular sensory epithelia. *Exp. Cell Res. Suppl.* **5**, 460—492 (1958).
- ESTABLE, C., M. REISSIG and E. DE ROBERTIS: Microscopic and submicroscopic structure of the synapsis in the ventral ganglion of the acoustic nerve. *Exp. Cell Res.* **6**, 255—262 (1954).
- FAWCETT, D. W.: Structural specializations of the cell surface. In S. L. PALAY, *Frontiers in Cytology*, p. 19—41. New Haven: Yale University Press 1958.
- FERNANDEZ, C.: The innervation of the cochlea (guinea pig). *Laryngoscope* (St. Louis) **61**, 1152—1172 (1951).
- Postmortem changes in the vestibular and cochlear receptors (guinea pig). *Arch. Oto-laryng.* (Chicago) **68**, 460—487 (1958).
- FINZI, A.: Ricerche istochimiche sull'organo del Corti di cavia — cellule sensoriali e cellule di Hensen. *Arch. ital. Otol.* **69**, 1—12 (1958).
- FRIEDMANN, I.: Electron microscope observations on "in vitro" cultures of the isolated fowl embryo otocyst. *J. biophys. biochem. Cytol.* **5**, 263—268 (1959a).
- The ultrastructural organisation of sensory epithelium in the developing fowl embryo otocyst. *J. Laryng.* **73**, 779—794 (1959b).
- GALAMBOS, R.: Microelectrode studies on the auditory nervous system. *Ann. Otol.* (St. Louis) **66**, 503—505 (1958).
- GRAY, E. G.: Electron microscopy of neuroglial fibrils of the cerebral cortex. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 121—122 (1959).
- , and R. J. PUMPHREY: Ultra-structure of the insect ear. *Nature* (Lond.) **181**, 618 (1958).
- IURATO, S.: Struttura submicroscopica delle cellule sensoriali dell'organo del Corti. *Mon. zool. ital. Suppl.* **68**, 356—361 (1959).
- Ricerche al microscopio elettronico sulla struttura delle cellule acustiche dell'organo del Corti. *Atti 47° Congr. Soc. ital. di Otorinolaringoiatria*, San Remo 1959. Vol. 2, p. 317—325.
- Structure submicroscopique des cellules ciliées de l'organe de Corti. *J. franç. Otorhinolaryng.* **9**, 67—75 (1960a).
- Submicroscopic structure of the membranous labyrinth. 1. The tectorial membrane. *Z. Zellforsch.* **51**, 105—128 (1960b).
- , e I. BERTOLETTI: Precisazioni sulla struttura di alcuni componenti dell'organo del Corti. *Atti Soc. ital. Micr. Elettr.* (in press).
- JEFFRES, L. A., and G. MOUSHEGIAN: Hearing. *Ann. Rev. Psychol.* **10**, 395—414 (1959).
- LORENZO, A. J. DE: Electron microscopic observations of the olfactory mucosa and olfactory nerve. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 839—850 (1957).
- Electron microscopic observations on the taste buds of the rabbit. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 143—150 (1958).
- MERKLE, N.: Eine Methode zur morphologischen Erfassung der Ansprechgebiete in der Cochlea des Meerschweinchens. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **117**, 504—519 (1954).
- PALAY, S. L.: Synapses in the central nervous system. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl., 193—201 (1956).
- , and G. E. PALADE: Electron microscope study of the cytoplasm of neurons. *Anat. Rec.* **118**, 336 (1954).
- PEASE, D. C., and A. QUILLIAM: Electron microscopy of the Pacinian corpuscle. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 331—342 (1957).
- PORTMANN, G., M. PORTMANN et C. PORTMANN: La double innervation de l'organe de Corti. *Acta oto-laryng.* (Stockh.) **43**, 226—238 (1953).
- RASMUSSEN, G. L.: An efferent cochlear bundle. *Anat. Rec.* **82**, 441 (1942).
- The olivary peduncle and other fiber projections of the superior olivary complex. *J. comp. Neurol.* **84**, 141—219 (1946).
- Further observations of the efferent cochlear bundle. *J. comp. Neurol.* **99**, 61—74 (1953a).
- Recurrent or "feed back" connections of the auditory system of the cat. *Anat. Rec.* **115**, 361 (1953b).

- ROBERTIS, E. DE: Electron microscope observations on the submicroscopic organization of the retinal rods. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, 319—330 (1956a).
- Submicroscopic changes of the synapse after nerve section in the acoustic ganglion of the guinea pig. An electron microscope study. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, 503—512 (1956b).
- Submicroscopic morphology and function of the synapse. *Exp. Cell Res. Suppl.* **5**, 347—369 (1958).
- , and H. S. D. BENNET: Quoted by DE ROBERTIS 1958.
- , and A. LASANSKY: Submicroscopic organization of retinal cones of the rabbit. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 743—746 (1958).
- ROSS, L. L.: Electron microscopic observations of the carotid body of the cat. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 253—262 (1959).
- SCHERPENBERG, H. J. C. v.: Electron microscopy of normal and regenerating olfactory epithelium in man and the cat. 1—96. Leiden: Universitaire Pers 1958.
- SJÖSTRAND, F. S.: The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by electron microscope. *J. cell comp. Physiol.* **42**, 15—44 (1953).
- SMITH, C. A.: Microscopic structure of the utricle. *Ann. Otol. (St. Louis)* **65**, 450—470 (1956).
- , and E. W. DEMPSEY: Electron microscopy of the organ of Corti. *Amer. J. Anat.* **100**, 337—367 (1957).
- SPOENDLIN, H. v.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Cortischen Organ des Meerschweinchens. *Pract. oto-rhino-laryng. (Basel)* **19**, 192—234 (1957).
- Submikroskopische Veränderungen am Cortischen Organ des Meerschweinchens nach akustischer Belastung. *Pract. oto-rhino-laryng. (Basel)* **20**, 197—214 (1958).
- Submikroskopische Organisation der Sinneselemente im Cortischen Organ des Meerschweinchens. *Pract. oto-rhino-laryng. (Basel)* **21**, 34—48 (1959).
- STEVENS, S. S.: Some similarities between hearing and seeing. *Laryngoscope (St. Louis)* **68**, 508—527 (1958).
- TASAKI, I.: Nerve impulses in individual auditory nerve fibres of guinea pig. *J. Neurophysiol.* **17**, 97—122 (1954).
- TOBIAS, J. M.: Biophysical aspects of conduction and transmission in the nervous system. *Ann. Rev. Physiology* **21**, 299—324 (1959).
- TRUJILLO-CENÓZ, O.: Electron microscope study of the rabbit gustatory bud. *Z. Zellforsch.* **46**, 272—280 (1957).
- Estructura de los neuromastos de *Cnesterodon decemmaculatus*. Estudio con el microscopio electrónico. *An. Fac. Med. Montevideo* **44**, 469—475 (1959).
- The fine structure of a special type of nerve fiber found in the ganglia of "Armadillium vulgare" (Crustacea-Isopoda). *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 185—186 (1960).
- VAGO, A.: Gli elementi dell'organo spirale della cavia studiati a fresco in contrasto di fase. *Arch. ital. Otol.* **66**, 155—185 (1955).
- VRIES, H. DE: Physiologie de la cellule ciliée du labyrinthe. Cours internat. sur l'appareil vestibulaire, Paris 15—21 Janvier 1955, p. 103—117. Paris: Presses Universitaires de France.
- WALSH, E. G.: Physiology of the nervous system, p. 260 to 286. London: Longmans, Green & Co. 1957.
- WÜSTENFELD, E., u. F. H. SPRENGER: Variationsstatistische Untersuchungen an den Sinneszellkernen des Cortischen Organs von Meerschweinchen. *Z. Zellforsch.* **48**, 720—734 (1958).
- ZORZOLI, G. C., and A. V. BORIANI: Recherches histochimiques sur les cellules ciliées de l'organe de Corti soumises à des stimulations acoustiques. *Rev. Laryng. (Bordeaux)* **79**, 213—220 (1958).

Dr. SALVATORE IURATO,
Istituto di Anatomia Umana Normale dell'Università di Milano,
via Mangiagalli 31, Milano, Italia

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.
2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten, rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich (möglichst in Maschinschrift) geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern beizufügen. Diktierter Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn mit ihnen ein neuer Gedankengang beginnt.
2. Die Arbeiten müssen *kurz* und stilistisch einwandfrei geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargestellt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen“, Handbüchern) herzustellen.

3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in einer der Kongreßsprachen abgefaßt sein kann.

5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote daraufhinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.

6. Die *Abbildungen* sind auf das unbedingt Notwendige zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur zur Illustration von Befunden dienen und ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. Knappe, klare Abbildungsunterschriften (Legenden) erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Sie sind getrennt von den Abbildungen dem Manuskript im Anschluß an das Literaturverzeichnis beizufügen. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Abbildung und Kurve. Bereits veröffentlichte Abbildungen können nicht wiederholt werden. Ausnahmen hiervon sind nur in besonders begründeten Fällen möglich. *Farbige* Bilder können in der Regel keine Aufnahme finden. Für Kurven oder Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden können, genügt die Ablieferung sauberer, klarer Skizzen, die vom Verlag umgezeichnet werden. Bei Halbtonbildern (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind saubere, scharfe und tonwertreiche Originalvorlagen (Hochglanzabzüge von Originalphotographien) notwendig. Besondere Wünsche des Autors hinsichtlich des linearen Verkleinerungs- und Vergrößerungsmaßstabes der Vorlagen sollen vermerkt werden.

- Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweis Pfeile oder Linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.

7. Literaturangaben sollen Autorennamen, vollständigen Titel der Arbeit, Zeitschrift, Band- und Seitenzahl sowie Jahreszahl umfassen [z.B. Böke, W.: Untersuchungen des Linsenepithels mit dem Phasenkontrastmikroskop. Z. Zellforsch. 38, 428—454 (1953)]. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alphabetisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammern gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

8. Methodik, Protokolle und weniger wichtige Teile des Textes sind für *Kleindruck* vorzuziehen. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.

9. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.

10. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig sind einzeilige Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.



Handbuch der allgemeinen Pathologie

Herausgegeben von Professor Dr. F. BÜCHNER, Freiburg i. Br.
Professor Dr. E. LETTERER, Tübingen · Professor Dr. F. ROULET, Basel
In zwölf Bänden

Zehnter Band

Umwelt I

Erster Teil

Strahlung und Wetter

Redigiert von F. ROULET

Mit 283 Abbildungen. IX, 434 Seiten Gr.-8°. 1960.

Ganzleinen DM 180,—

Bei Verpflichtung zur Abnahme des Gesamtwerkes

Subskriptionspreis Ganzleinen DM 144,—,

jedoch ist jeder Band und Bandteil zum Ladenpreis einzeln käuflich

INHALTSÜBERSICHT

Allgemeine Strahlenbiologie. Von H. FRITZ-NIGGLI, Zürich · Radio-Histologie und Radio-Histopathologie. Von H. U. ZOLLINGER, St. Gallen · Biologie und Pathologie des sichtbaren Lichtes, des Ultravioletts und des Infrarots. Von G. MIESCHER, Zürich · Die durch elektrischen Strom bedingten Veränderungen am menschlichen Körper. Von F. SCHWARZ, Zürich · Wetter, Jahreszeit und Klima als pathogenetische Faktoren. Von B. DE RUDDER, Frankfurt a. M. · Literatur · Namen- und Sachverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG